

## 平成12年度各分野における各種学会等の受章(賞)者

雑誌名	東北医学雑誌
巻	113
号	1
ページ	67-99
発行年	2001-08-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/51254">http://hdl.handle.net/10097/51254</a>

— AACR: Young Investigator Award for Promising Cancer Research —

# Intratumoral delivery of hepatocyte growth factor antagonist (HGF/NK4) gene by adenoviral vector suppresses the tumor growth of human lung cancers *in vivo*

前 門 戸 任

東北大学加齢医学研究所 呼吸器腫瘍研究分野



## はじめに

1980年代後半に肝再生因子の本体として中村らによって発見された肝細胞増殖因子 (HGF)<sup>1)</sup> のはたらきは、肝細胞にとどまらず、他の上皮細胞をはじめ内皮細胞にも及び増殖、分化、遊走を刺激し、血管新生作用を含め多彩な活性を示す<sup>2)</sup>。一方、癌においてこのHGFの作用は腫瘍の増殖、浸潤、転移を促進する方向にはたらき、腫瘍血管の増生を促す。また、腫瘍細胞によっては、HGFのレセプターであるcMetが過剰発現しており癌化のメカニズムの一つになっている<sup>3)</sup>。

近年伊達らによりHGFの $\alpha$ 鎖に相当する分子内断片NK4が、HGFのアンタゴニストとしての作用をもち強力な抗腫瘍活性を持つことが報告された<sup>4,5)</sup>。我々は、このNK4を高発現するアデノウイルスベクターを作製し、ヒト肺癌に対する抗腫瘍効果を検討した。

## HGFとNK4

HGFは69 kDaの $\alpha$ 鎖と34 kDaの $\beta$ 鎖からなるヘテロダイマーで、 $\alpha$ 鎖はN末端よりヘパリン結合部位であるヘアピンループドメインとそれに引き続く4つのクリングルドメインからなる。 $\alpha$ 鎖はcMetレセプターへの結合に重要であり、 $\beta$ 鎖はその結合の安定化に関与する。NK4はこのHGFの分子内断片で、ほぼHGF $\alpha$ 鎖に相当しヘアピンループドメインと4つのクリングルドメインをもつ (図1A)。cMetレセプ

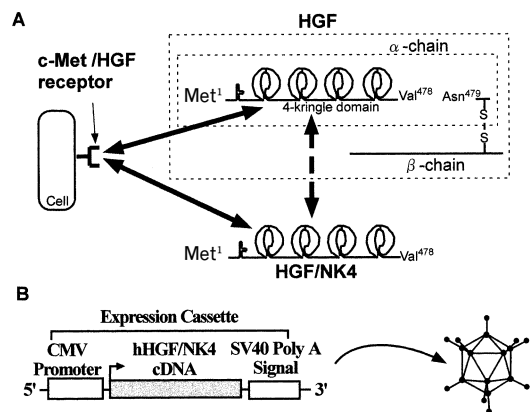


図1. NK4とアデノウイルスベクターの構造  
NK4はHGFの $\alpha$ 鎖に相当する分子内断片であり (A)、アデノウイルスに組み込んだ発現カセットはCMVプロモーターによりドライブされる (B)。

ターに結合するが、シグナル伝達はず HGF に対し競合的に阻害する。我々は NK4 cDNA を CMV プロモーターでドライブする発現カセットを非増殖性アデノウイルスベクターに組み込み (AdCMV.NK4, 図1B)、その発現、分泌を確認した後、抗腫瘍効果の検討に用いた。

## NK4の抗腫瘍効果

まず、cMetレセプターを発現しているが、HGFを分泌していない肺腺癌細胞株 H358 に AdCMV.NK4 を感染させ、*in vitro* 細胞増殖を抑制するかどうか検討したが、AdCMV.NK4 は細胞増殖に影響を与えなかった。次に同じ細胞株をヌードマウスに皮下移植し、

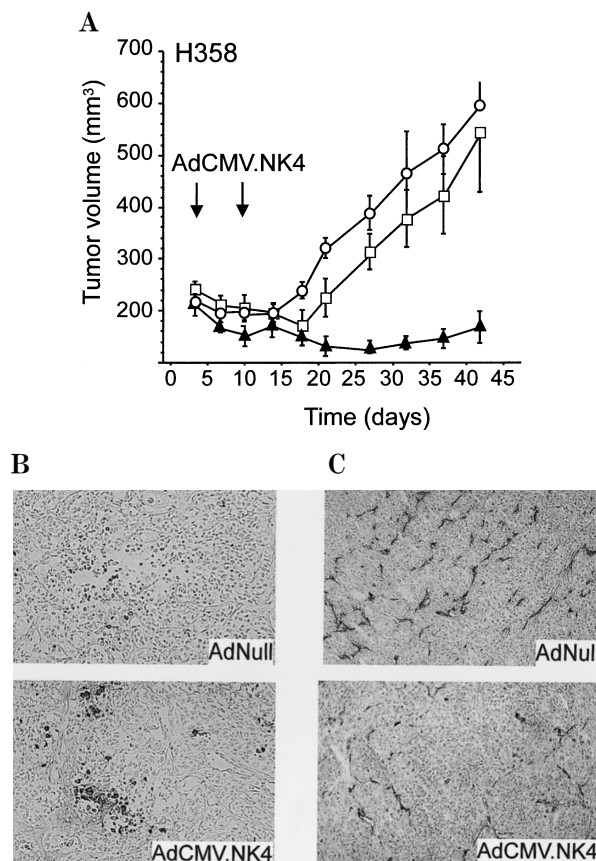


図2. NK4 アデノウイルスベクター (AdCMV.NK4) の抗腫瘍効果  
AdCMV.NK4 の腫瘍内投与により著しい腫瘍増殖抑制効果を示した (A, ○: PBS, □: AdNull, ▲: AdCMV.NK4). その腫瘍組織ではアポトーシスが增加しており (B: TUNEL), 腫瘍血管の減少 (C: 抗 CD31 抗体) が認められた.

樹立した腫瘍に AdCMV.NK4 を移植 2 週間以内に 2 回投与すると著しい腫瘍増殖抑制効果を示した (91% 縮小, 42 日目, 図 2-A). 腫瘍を摘出し TUNEL 法にてアポトーシス細胞を染色すると, 腫瘍中心部に偏在してアポトーシス細胞の増加が認められた (図 2-B). さらに抗 CD31 抗体を用い血管の免疫染色を行うと AdCMV.NK4 投与群において有意に腫瘍血管が減少していた (図 2-C). *in vitro* と *in vivo* における NK4 による反応の相違は NK4 による抗腫瘍効果が宿主由来の腫瘍血管に対する作用が主であることを裏付けている. また, 腫瘍中心部のアポトーシスの増加もその分布より血流障害による可能性が強いと考えられる.

### NK4 の血管新生阻害作用

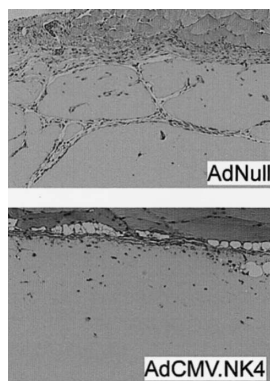
次に NK4 による抗血管新生作用をマトリゲルを用

いた非担癌マウスにおいて検討した. マトリゲルに HGF を混和しマウス腹部皮下に注入し, 引き続いてマウス腹腔に AdCMV.NK4 を投与し 6 日後にマトリゲルを摘出し侵入した血管数を分析した. 図 3 に示すように AdCMV.NK4 投与群でほとんど血管侵入が認められなかった. この結果により NK4 の血管新生阻害作用が非担癌マウスにおいても証明しえた.

### おわりに

HGF アンタゴニスト, NK4 をコードしたアデノウイルスベクターを作製し, *In vivo* において強力な抗腫瘍活性を示し, 血管新生阻害作用が主な作用メカニズムと推察された. この後の研究により NK4 が cMet を介さない抗血管新生作用を持つことが判明し, NK4 は腫瘍に対し HGF-cMet シグナリングと腫瘍血管の

A



B

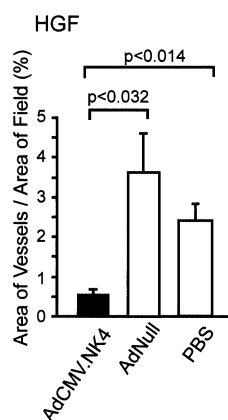


図3. マトリゲルを用いた AdCMV.NK4 による *in vivo* 血管新生抑制効果  
HGF による血管新生に対し AdCMV.NK4 が抑制した。

二つの標的を合わせもつことになった。また、上述した *in vivo* の実験においてマウスに副作用はほとんど認められなかった。NK4 は日本で創出された分子であり日本独自の治療法として今後の臨床応用が期待される。

## 文 献

- 1) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989; **342**: 440-3.
- 2) Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem (Tokyo)* 1996; **119**: 591-600.
- 3) Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM. Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 1991; **6**: 1997-2003.
- 4) Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett* 1997; **420**: 1-6.
- 5) Date K, Matsumoto K, Kuba K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 1998; **17**: 3045-54.

—— 日経 BP 社: 2000 年日経 BP 技術賞 (医療・バイオ部門) ——

## 低侵襲脳外科手術戦略システムの開発

吉本 高志, 伊関 洋\*, 高倉 公朋\*

東北大学大学院 神経外科学, 東京女子医科大学\*



### はじめに

低侵襲手術では開腹や大きな開頭が不要なため, 患者の肉体的, 精神的負担の軽減, 入院期間の短縮など医療費削減効果も高く, 高齢化社会における望ましい外科治療として高く評価されている。しかし低侵襲手術

は執刀医の視野や患部への到達経路に強い制約を課すものであるため, 適切な器具や支援システムなしには行えない。

特に狭い術野での微細な手術操作を可能にする外科医の「新しい手」となるマニピュレータシステムは, 従来使用しているハサミやメスなどの器具に加えるべき, 高機能で使いやすい手術デバイスであることが必要である。このようなデバイスを思い通りに操るには「新しい目」が必要である。術野を観察するための高機能内視鏡等の光学装置だけでなく, 手術中に随時三次元的撮影を行える術中イメージング (超音波断層・MRI・CT など) や様々な医用画像装置で得た情報を総合して手術計画を作り, その手術計画を術中に分かり易く提示し, あるいは遠隔地にいる専門家の助言を受けるなどの機能を含む, リアルタイム総合情報システムを開発した。

### 外科医の新しい目 (HvisCAS: High definition Visual Computer Aided Surgery System)

ハイビジョン立体ビデオ顕微鏡システムは, 顕微鏡・内視鏡等の映像で術野を観察するのみならず, 様々な医用画像装置で得た情報を総合して手術計画を作り, その手術計画を術中に分かり易く提示し, あるいは遠隔地にいる専門家の助言を受けるなどの機能を含む, リアルタイム総合情報システムである。立体ビデオ顕微鏡は, 顕微鏡と顕微鏡像をハイビジョンカメラ



図 1. 外科医の新しい目 (HvisCAS: High definition Visual Computer Aided Surgery System)

で撮影して小型液晶モニタに立体映像として表示するモニタが分離しているため作動距離 (顕微鏡と被観察物の距離) を 60 cm まで離すことができる。また単なる脳外科手術用顕微鏡ではなく, 体内パーチャルリアリティ透視システムとして肉眼手術や他の分野の外科手術にも応用できる (図 1)。

### 外科医の新しい手 (HUMAN: Hyper Utility Mechatronic AssistaNt)

外科治療の歴史は, 戦争の武器・戦術・戦略の発達と似ている。メス・ハサミなどの道具の改良にはじまり, 今ではコンピュータを使った迅速な医療情報処理と可視化技術にもとづいて手術戦略を構築する時代を迎え, 低侵襲手術手技によるいわば「ピンポイント攻撃」の重要性が高まっている。低侵襲手術治療を推進する上では, 微細操作における外科医の技能の限界を超えるための道具装置が必要である。人間の手の動きや形態を模倣する必要はない。また設定された命令だけを忠実に遂行する産業用ロボットのようなものも適さない。むしろ, 思うがままに動く道具であって, 外科医の肉体的技能によらず一定の微細操作能力で手術ができる手術支援マニピュレータが望ましい。我々が



図2. 外科医の新しい手 (HUMAN: Hyper Utility Mechatronic Assistant)

目指す手術支援マニピュレータとは、インテリジェント・マニピュレータシステムである。普通の手術器具を手を持って操作する際、外科医は視覚と並んで「手応え」の微妙な感覚に依存している。しかし手術マニピュレータにおいては手応えを人工的に作り出してフィードバックしなくてはならない。このようなフィードバックには代行感覚を用いるのが適当である。接触したかどうか・力の大きさ・硬さ・滑らかさなどをセンサーで測定し、それらを統合して図形・色・音などに置き換え、リアルタイムで表示するのである。温度や匂いも、また人間が本来持っていない感覚、たとえば物体からどのくらい離れているかを表す「近接

覚」も同じ体系で表現することができる。このように、手術マニピュレータの先端に自分の手と目があるかのように感じられる操作環境 (tele-existence) を提供することによって初めて、外科医はマニピュレータを自在にあやつって安全・確実に操作できるようになる(図2)。

## おわりに

開発した本システムは、① 医療のあらゆる局面の「可視化」された情報をチームで共有し、② チームによる客観的で適切な意思決定と作業分担を行い、③ デジタル化された客観的データに基づき、④ 治療(手術)戦略のナビゲーションの基に、⑤ 高いレベルで品質が安定した低侵襲手術治療を確実に提供することができる仕組みである。

## 文 献

- 1) 伊関 洋, 高倉公朋, 岡田芳和他. 脳神経外科におけるバーチャルリアリティ. 先端医療シリーズ 6・脳神経外科. 高倉公朋監修. 先端医療研究所. 東京, 2000: 269-76
- 2) 伊関 洋, 奥寺 敬, 谷崎義生, 村垣善浩, 小林茂昭, 吉本高志, 堀 智勝, 高倉公朋. 外科医の新しい目・手・脳. 21世紀の定位脳手術. 機能的脳神経外科 40: 1-7, 2001

—— 日本超音波医学会：第1回奨励賞 ——

## 21世紀の超音波医学

—— 超音波による細胞とのコミュニケーション ——

西 條 芳 文

東北大学加齢医学研究所 病態計測制御研究分野



### はじめに

「超音波によるコミュニケーション」として一般に思い浮かぶのは、イルカやコウモリたちの会話や障害物の検知であろう。イルカは2 kHz から150 kHzまでの音を聴く能力があり、さらに目的に応じて周波数を切り替えている。例えば、仲間同士の会話には周波数20 kHz近辺の超音波を用い、魚群探査には150 kHzの超音波を用いているのである。

一般に通信に用いられている「波」は電波や光である。それでは、これらの既に確立された情報伝達のための「波」に対する超音波の優位性は何であろうか？超音波は小さい変動位でも高い音圧と強力なパワー密度を持つ。したがって、情報とともに音の振動エネルギーおよび運動エネルギーを伝達することが可能な点が、ほかの「波」に対する優位性ということになる。

また、生体組織は粘弾性体と仮定されることが多いが、超音波の音速は物質の弾性と、超音波の吸収は物質の粘性とそれぞれ密接な関係があるため、超音波により生体の粘弾性を計測することが可能である。

近年、生体組織のバイオメカニクス計測の意義が明らかにされており、その対象は細胞にまで微視化されている。本稿では、超音波による細胞のバイオメカニクス計測と、細胞への音響エネルギー伝達による情報伝達の試みについて簡潔に述べる。

### 細胞のバイオメカニクス計測

当研究分野では1985年に超音波顕微鏡の医学・生物学への応用を開始して以来、様々な組織の音響特性を計測してきた<sup>1)~6)</sup>。従来の光学顕微鏡が組織の化学的性質に注目して、特定の物質を染色し観察することを



図1 1.0 GHzの超音波顕微鏡によるヒト腎動脈血管平滑筋細胞。干渉縞は細胞の厚みを反映している。

その原理とするのに対し、超音波顕微鏡は組織の物理的性質の違いを超音波の音速や減衰の違いにより検出することを原理としている。

超音波顕微鏡の空間分解能は周波数200 MHzで5  $\mu\text{m}$ 、周波数1.0 GHzでは1  $\mu\text{m}$ である。さらに、超音波の位相を用いることで、距離分解能は100 MHzで0.1  $\mu\text{m}$ を実現している。したがって、超音波顕微鏡の解像度は細胞のバイオメカニクス計測への応用に十分なレベルと考えられる。

図1は周波数1.0 GHzの超音波顕微鏡によるヒト腎動脈平滑筋細胞の音響画像である。細胞表面での反射波と、ディッシュ表面での反射波の位相が一致するときには反射波は強く、位相が反転しているときには反射波は弱くなる。細胞の厚みは中央が厚く辺縁部が薄いためにこのような干渉縞が生じることになる。1つの細胞を経時的に観察し、形状や干渉縞の変化を解析することで、緩やかな細胞の運動について検討する

ことが可能である。

### 低容量超音波の血管内皮細胞に対する影響

超音波の細胞に対する影響を検討するために、周波数 32 kHz の平面振動子を用いて、HUVEC に熱やキャピテーションが発生しない程度の低容量の超音波を 30 分間照射した。照射前に細胞に NO の蛍光抗体である DAF-A2 を与え、照射後の細胞内の NO 産生を蛍光顕微鏡により半定量的に計測した。

結果、HUVEC に低容量超音波を照射した群ではコントロール群と比較して約 10% の NO 産生増加が認められた。低容量超音波による NO 産生増加は、微小振動により細胞内の NO が放出された結果と考えられた。将来的には血管の弛緩や細胞内の情報伝達促進を、薬物の全身投与ではなく、超音波の局所照射によりコントロールする技術に応用可能と考えられた。

### 結 語

超音波により細胞からバイオメカニクスの変化に関する情報を受信し、細胞に対し NO 産生増加を促す情報を送信できることが実証された。21 世紀の超音波テクノロジーとして、細胞とのコミュニケーションに関する研究がさらに進んでいくことが期待される。

### 文 献

- 1) Saijo Y, Tanaka M, Okawai H, Dunn F: The ultrasonic properties of gastric cancer tissues obtained with a scanning acoustic microscope system. *Ultrasound in Med and Biol* Vol 17, No 7; 709-714, 1991.
- 2) Saijo Y, Chubachi N: Microscopy. *Ultrasound Med Biol* Vol 26, Suppl 1; S30-32, 2000.
- 3) Saijo Y, Tanaka M, Okawai H, Sasaki H, Nitta S, Dunn F: Ultrasonic tissue characterization of infarcted myocardium by scanning acoustic microscopy. *Ultrasound in Med Biol* Vol 23, No 1; 77-85, 1997.
- 4) Saijo Y, Jorgensen C, Falk E, Nitta S: Collagen characterization of fibrous caps in Apo-E deficient mice by acoustic microscopy. *Circulation* Vol 100, No 18; I-251, 1999.
- 5) Saijo Y, Sasaki H, Okawai H, Nitta S, Tanaka M: Visualization of living cells by acoustic microscopy. *Acoustical Imaging* Vol 23; 7-12, 1997.
- 6) Saijo Y, Sasaki H, Sato M, Nitta S, Tanaka M: Visualization of human umbilical vein endothelial cells by acoustic microscopy. *Ultrasonics* Vol 38, No 1-8; 396-399, 2000.



## 慢性虚血肢に対するニトログリセリンの 経皮的直接投与の有用性

力丸 裕人, 佐藤 成

東北大学大学院医学系研究科 先進外科学分野



### 1 研究背景, 目的

ニトログリセリン (Nitroglycerin, 以下 NTG) は, 虚血性心疾患に対する治療薬として広く用いられている<sup>1)</sup>. 一方, NTG の下肢慢性動脈閉塞症に対する効果についての過去の報告はほとんどな

く<sup>2,3)</sup>, これまで, 本症に対する NTG の使用, 虚血肢に対する直接投与は, 一般的ではなかった.

我々は, 下肢慢性動脈閉塞症症例において, 虚血肢に NTG テープ剤などを直接投与することによって, 症状の改善を認める症例を複数経験し, その意義を示すべく, 本研究を施行することとした.

### 2 方 法

#### 経皮酸素・二酸化炭素分圧測定

下肢慢性動脈閉塞症症例 15 例を対象とし, NTG テープ剤 5 mg を下腿後面に貼付し, 経皮酸素・二酸化炭素分圧の変化を測定した.

#### 近赤外分光法による下腿筋血流評価

閉塞性動脈硬化症症例 25 例を対象とし, NTG テープ剤 5 mg を下腿後面に貼付し, トレッドミルにて時速 2.4 km, 距離 100 m, 傾斜 12% の歩行負荷を施行し, 2 波長型近赤外分光測定装置にて, 酸素化ヘモグロビンが検査前安静時の値に戻るまでの時間(回復時間)を測定した.

#### レーザードップラー血流計による皮膚血流の測定

下肢慢性動脈閉塞症症例 17 例を対象とし, NTG 軟膏 12 mg を Lisfranc 関節より遠位に投与後, レー

ザードップラー血流計を用い, 皮膚血流の変化を記録した.

#### NTG テープ剤, 軟膏投与症例における NTG 血中濃度測定

下腿への NTG テープ剤 5 mg 投与例 6 例, 足部への NTG 軟膏 12 mg 投与例 8 例の, 投与側大腿静脈血ならびに上肢静脈血について NTG 血中濃度測定を行った.

### 3 結 果

#### 経皮酸素・二酸化炭素分圧測定

NTG テープ 5 mg の虚血肢への直接投与後, 経皮酸素分圧は  $24.3 \pm 19.6$  mmHg から  $41.1 \pm 22.0$  mmHg へと有意に上昇し ( $p < 0.0001$ ), 二酸化炭素分圧は,  $50.1 \pm 8.54$  mmHg から  $44.5 \pm 5.53$  mmHg へと有意に低下した ( $p < 0.001$ ). 78% に自覚症状の改善を認めた.

#### 近赤外分光法による下腿筋血流評価

NTG テープ 5 mg 投与前の回復時間 ( $4.26 \pm 2.60$  分) に比べ, 測定側投与後は有意な短縮を認めた ( $3.65 \pm 2.06$  分;  $p < 0.05$ ). また, 対側投与後も, 投与前に比べて短縮を認めた ( $3.84 \pm 2.20$  分;  $p < 0.05$ ). 測定側投与後と, 対側投与後の回復時間の間に, 有意差を認めなかった. 64% に自覚症状の改善を認めた.

#### レーザードップラー血流計による皮膚血流測定

NTG 軟膏 12 mg 投与前の皮膚血流 ( $68.74 \pm 58.74$  BPU) に対し, 投与 2 時間後では ( $143.46 \pm 106.63$  BPU) と, 有意な上昇を認めた ( $p < 0.001$ ). 対側も上昇を認めたが ( $79.53 \pm 54.51$  vs.  $97.66 \pm 54.13$  BPU;  $p < 0.05$ ), 増加率でみると, 投与側  $266.2 \pm 197.0\%$  に対して, 対側  $138.7 \pm 61.0\%$  と, 投与側で有意に増加率が

高かった ( $p < 0.05$ )。82% に自覚症状の改善を認めた。

#### NTG テープ剤, 軟膏投与症例における NTG 血中濃度測定

NTG テープ剤 5 mg, NTG 軟膏 12 mg 投与 2 時間後の投与側大腿静脈血中での NTG 血中濃度は,  $9.99 \pm 7.09$ ,  $23.55 \pm 27.46$  ng/ml であり, 上肢静脈血中濃度は, 0.3 ng/ml 未満,  $0.399 \pm 0.224$  ng/ml で, 投与側大腿静脈で, 有意に高濃度を示した (いずれも  $p < 0.05$ )。

#### 4 考 察

今回の検討で, 虚血肢に対する NTG の経皮投与によって, 投与側皮膚血流の増加を認め, また, NTG 投与側の皮膚血流の増加率が対側に比べ有意に高いという結果が得られ, 本法は, 下肢慢性動脈閉塞症に対する有効な治療法であり, NTG の患肢に対する直接的投与に意義があることを示していると考えられた。

NTG 投与による血流改善の機序については不明である。NTG は, 生体内で一酸化窒素 (Nitric oxide: NO) を放出し, 動静脈の拡張作用を有する<sup>1)</sup>。虚血肢では, 側副血行路に相当する動脈において血管拡張が得られ, 血流改善が生じていると考えられる。

患肢に対する直接的投与の意義については, NTG 血中濃度の検討で, 経皮投与後の NTG 血中濃度が, 投与側大腿静脈血中において 10~20 ng/ml と高濃度を示しており, これは, 胸部へのテープ剤, 軟膏の常用量投与によって得られる血中濃度 (0.3~1.0 ng/ml) の十~数十倍であり, NTG 投与側肢において, 上肢静脈血中濃度に比して, 非常に高濃度となっている。皮膚より吸収された NTG が, 患肢静脈中を高濃度で還流しつつ NO を放出し, 患肢に対して効果的に作用するものと考えられる。NTG による動脈拡張作用は, 静脈

拡張作用に比べ, より高い血中濃度にて生じることも報告<sup>4)</sup>されており, このことから, 患肢に対する直接投与の意義が大きいことが示唆される。

#### 5 結 論

虚血肢に対する NTG の経皮投与によって, 虚血状態の改善が認められ, NTG の患肢に対する直接的投与の意義があることが示された。虚血肢に NTG テープ剤などを直接投与する本法は, 安価で, 患者自身が, 簡便に, 継続して行える治療法であり, 下肢慢性動脈閉塞症に対する, 有用な治療法であると考えられた。

(本研究の一部は, 文部省科学研究費補助金 (10671091) の助成による。)

#### 文 献

- 1) Ahlner, J., Andersson, R.G.G., Torfgard, K., et al. (1991) Organic nitrate esters: Clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacological Reviews*, **43**, 351-423.
- 2) Khawaja, H.T., Weaver, P.C. (1988) Transdermal glyceryl trinitrate as predictor of outcome of lumbar sympathectomy. *Lancet*, **i**, 418-419.
- 3) Fletcher, S., Wright, M., Wilkinson, A., et al. (1997) Locally applied transdermal nitrate patches for the treatment of ischemic rest pain. *International Journal of Clinical Practice*, **51**, 324-325.
- 4) Nakajima, H., Nosaka, K. (1983) A comparison of the effects of diltiazem and nitroglycerin on the norepinephrine-induced contractions in the isolated femoral artery and vein. *The Japanese Journal of Pharmacology*, **33**, 1282-1285.

## 喀痰細胞診を併用した肺癌検診 16 年の診断治療成績

佐 藤 雅 美

東北大学加齢医学研究所 呼吸器再建研究分野



### はじめに

肺癌検診の有効性に関しては、議論のあるところであるが、厚生省がん研究助成金藤村班では、日本でも積極的に肺癌検診を施行している 3 地域において、肺癌死亡の減少がもたらされていることを示した。そこで、

その中の一地域である宮城県のカラコ細胞診を併用した肺癌検診 16 年間の診断・治療成績について分析し、問題点も含めて報告した。

### 対象および方法

宮城県では 1982 年より、胸部間接レントゲン写真とカラコ細胞診を併用した肺癌検診を開始した。カラコ細胞診の対象者は 50 歳以上の男性喫煙者で喫煙指数 600 以上、あるいは過去 6 ヶ月以内に血痰のあったものとしている。カラコは、集細胞方式により処理し、中等度異型扁平上皮細胞以上の細胞が観察された場合、指導医による判定を行った。癌疑い (D 判定) 以上の場合に気管支鏡による徹底した精検を行った。1986 年 9 月よりは気管支全支擦過法を、また、1997 年 11 月からは蛍光気管支内視鏡を導入した。

### 結 果

検診開始からの 16 年間にのべ 3994285 名の受診者に間接 X 線写真による検診を、また、その 4.8% にあたる 192982 名にカラコ細胞診を施行した (表-1)。X 線写真により 1294 例の原発性肺癌が発見され、その発見率は受診者 10 万対 32.4 であった。カラコ細胞診で陽性または疑陽性と診断された症例は 852 例であった。これらのうち、806 例 94.6% が呼吸器を専門とする医療機関を受診し、そのうち、786 例 92.3% に気管支鏡検査が

表-1. 宮城県における 16 年間の肺癌検診成績

受診者: 3,994,285 名  
カラコ細胞診陽性・疑陽性例: 852 例  
X 線発見肺癌: 1,294 例  
(32.4/100,000)

#### 初回検査結果

原発性肺癌:	342 例 (177.2/100,000)
耳鼻咽喉科領域癌:	55 例
既確定肺癌:	13 例
転移性肺癌:	4 例
多発性骨髄腫:	1 例

#### 経過観察またはがん登録により判明したもの

原発性肺癌:	60 例
耳鼻科領域癌:	18 例
転移性肺癌:	1 例

表-2. 集検の発見方法別にみた肺癌例の組織型分布

	X-ray film	Sputum cytology
Squamous cell carcinoma	360 (27.7%)	208 (80.0%)
Adenocarcinoma	686 (52.7%)	31 (11.9%)
Large cell carcinoma	118 ( 9.1%)	9
Small cell carcinoma	102 ( 7.8%)	8
Other	30	2
Unknown	5	2

施行された。初回精査の結果、342 例の原発性肺癌と 55 例の耳鼻咽喉科領域癌、13 例の既確定癌、4 例の転移性肺癌、1 例の多発性骨髄腫が診断された。さらに、経過観察により 60 例の原発性肺癌と 18 例の耳鼻科領域癌、1 例の転移性肺癌が確定した。カラコ細胞診による初回精査時の原発性肺癌の発見率は受診者 10 万対 177.2 で、間接 X 線写真の 5.5 倍であった。表-2 に発見された原発性肺癌例の組織型分布を示す。カラコ発見例では、その 80% の 208 例が扁平上皮癌であった。一方、間接 X 線写真では、686 例 52.7% を腺癌が占め、ついで扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌の順であった。

表-3. 発見方法別にみた集検発見肺癌の臨床病期

	X-ray film	Sputum cytology
cStage 0	0	16
cStage I	732	253
cStage II	82	13
cStage III	320	42
cStage IV	151	12
Unknown	14	5

発見方法別にみた，肺癌の病期は 0-I 期の割合が喀痰発見例 78.9%であったのに対し，間接 X 線発見例 56.4%であった(表-3)．図-1 に発見方法別の生存曲線を示す．喀痰例の 5 年生存率は 87%で，X 線発見例の 56%と比較し有意に予後良好であった．

## 考 察

喀痰細胞診による癌発見例には早期癌症例が多数含まれ，その発見率もレントゲンによるものより高率で，治療成績も良好であった．一方，検診全体で発見された扁平上皮癌 568 例に占める喀痰発見例の比率は，208 例(36.6%)と，高率とは言えなかった．このことから，喫煙例における喀痰細胞診検査の受診の徹底が重要と思われた．また，喀痰細胞診で発見される早期癌のほ

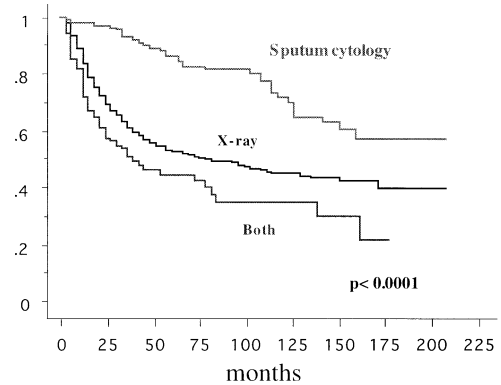


図 1: 発見方法別にみた集検発見肺癌例の生存曲線

とんどが扁平上皮癌例であり，世界的に増加している腺癌への対応として CT 検診などの導入も必要と思われた．

なお，本研究は宮城県肺癌対策協議会，東北大学加齢医学研究所，宮城県対がん協会，結核予防協会宮城県支部，および宮城県内の基幹病院による多施設共同研究である．

Ikedai-Datai Prize は，世界ではじめて軟性気管支鏡を開発した池田茂人博士の業績を記念して世界気管支学会学会賞として贈られるものである．

—— 第 11 回世界気管支学会: Poster award Prize ——

## 経気管超音波内視鏡 (TUS) を用いた胸部 X 線無所見肺癌の 深達度診断への応用

高 橋 博 人

東北大学加齢医学研究所 呼吸器再建研究分野



### はじめに

胸部 X 線無所見肺癌の治療方針決定において最も重要なのは癌の深達度診断である。癌が軟骨を越えて浸潤すると高率にリンパ節に転移する<sup>1)</sup>。癌の深達度は気管支鏡所見, 細胞診所見より推測が可能である<sup>2,3)</sup> が, よりリアルタイムな診断法として TUS<sup>4,5,6)</sup> の超音波像より深達度診断を実施し, PDT, 手術等の治療効果と比較検討した<sup>7)</sup>。

### 対 象

1996.10~1999.12 まで, 21 名の胸部 X 線無所見肺癌患者の 22 病変に対し, TUS を実施した。

### 方 法

使用機種はオリンパス社製超音波観測装置 EU-M30 及び気管支鏡用細径プローブ XUM-B20-26R (20MHz) である。バルーン付きシースを装着した細径プローブを BF1T40 の径 2.8 mm の鉗子孔より挿入し, 気道内で蒸留水で拡張させたバルーンを気管支壁に接触させ, ラジアル像として観察した<sup>4)</sup>。

正常気管支の層構造は TUS 上 5 層に描出された。内側より第 1 層がバルーン及び粘膜上皮層, 第 2 層が筋層, 筋外層, 第 3 層が筋外層と軟骨の境界エコー, 第 4 層が軟骨層, 第 5 層が軟骨と軟骨外層の境界エコーである。エコー輝度としては内側より高, 低, 高, 低, 高と描出され, 軟骨が第 3, 4, 5 層として良好に描出された (図 1)。

超音波像より癌の深達度を判断し, A 群: 軟骨内浸潤, B 群: 軟骨または軟骨外浸潤の 2 群に分類した。

患者は放射線治療, PDT または手術が実施された。

### Layer structure

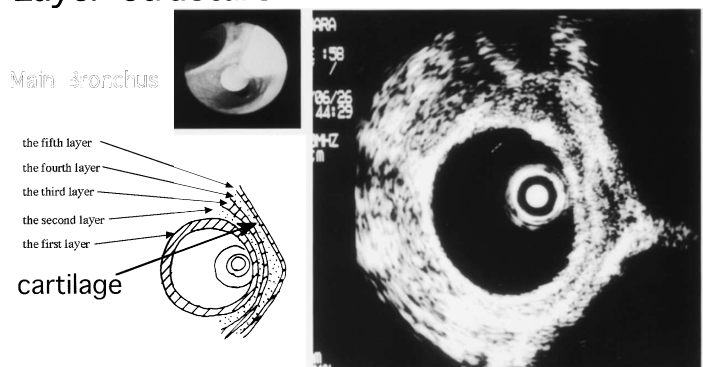


図 1. TUS における正常気管支の層構造

正常気管支の層構造は TUS 上 5 層に描出され, 内側より第 1 層がバルーン及び粘膜上皮層, 第 2 層が筋層, 筋外層, 第 3 層が筋外層と軟骨の境界エコー, 第 4 層が軟骨層, 第 5 層が軟骨と軟骨外層の境界エコーである。エコー輝度としては内側より高, 低, 高, 低, 高と描出され, 軟骨が比較的良好に描出される。

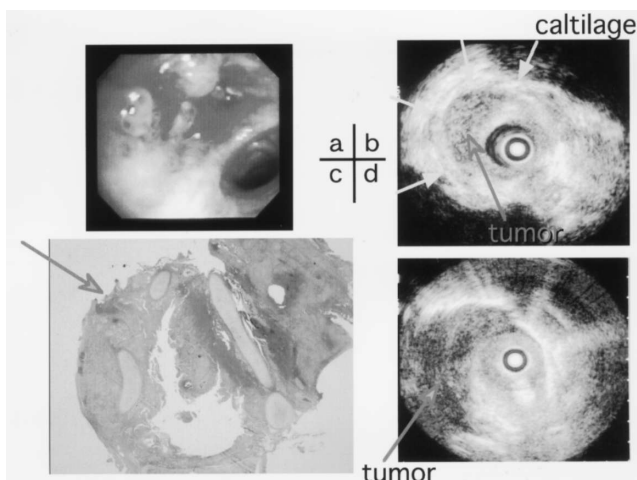


図 2. 1 例提示

左 B<sup>1+2</sup> の壁外浸潤例です。TUS では b の位置では軟骨がおえるが、d では軟骨が明瞭に终えず、腫瘍は明らかに軟骨を越えて浸潤していると判断した。TUS 上 B 群に分類し、手術後の病理診断でも壁外浸潤が確認された。

臨床病理学的所見、治療効果を TUS 像と比較検討した。

### 1 例 提 示

左 B<sup>1+2</sup> の胸部 X 線無所見肺癌で、壁外浸潤例である。TUS では b の位置では軟骨がおえますが、d では軟骨が明瞭に终えず、腫瘍は明らかに軟骨を越えて浸潤していると判断した。TUS 上 B 群に分類した。手術後の病理診断でも壁外浸潤が確認された（図 2）。

### 結 果

22 病変の内 TUS で軟骨内浸潤と判断した A 群は 14 病変である。うち 10 病変に PDT が施行され、9 例は CR を得、1 例に再発が認められた。他の 4 病変に手術が施行され、病理診断は 3 例が軟骨内浸潤で TUS 所見と一致したが、1 例は軟骨を越えていた。

TUS で軟骨または軟骨外浸潤と判断した B 群は 8 病変である。うち 4 病変に手術が施行され、病理診断は 3 例が軟骨外浸潤で TUS 所見と一致したが、1 例は軟骨内に限局していた。2 病変に PDT が施行され、1 例は再発し、1 例は CR を得た。残る 2 病変に対し、放射線治療が施行され CR を得た。

2 例の放射線治療例を除いて TUS の深達度診断と治療効果または病理診断を比較検討したのが、表 1 である。TUS の深達度診断と治療効果または病理診断が

表 1

	Pathological Group A or PDT : CR	Pathological Group B or PDT : notCR/ recurrent	Total
Ultrasonographical Group A	12	2	14
Ultrasonographical Group B	2	4	6
Tota	14	6	20

Concerning the invasion within bronchial cartilage  
Sensitivity=12/14=85.7%

Accuracy=16/20=80.0%

Specificity=4/6=66.7%

Positive predictive value=12/14=85.7%

2 cases treated by irradiation were omitted from the analysis.

2 例の放射線例を除いて表にまとめた。TUS の深達度診断と治療効果または病理診断が一致したのは 20 例中 16 例、不一致が 4 例であった。sensitivity 85.7%, specificity 66.7%, accuracy 80%, positive predictive value 85.7% であった。

一致したのは、20 病変中 16 病変で、不一致であったのが 4 病変であった。Sensitivity 85.7%, Specificity 66.7%, Accuracy 80.0%, Positive predictive value 85.7% であった。

## 考 察

今回胸部 X 線無所見肺癌 22 病変に対し, TUS 深達度診断を試み, 14 病変が軟骨内浸潤 A 群, 8 病変が軟骨または軟骨外浸潤 B 群と診断された. 放射線治療を施行した 2 病変を除く 20 病変のうち TUS の深達度診断と病理診断や治療効果が一致したのは 16 病変 (80.0%) で, 一致しなかったのが 4 病変 (20%) であった. 胸部 X 線無所見肺癌に対する TUS の深達度診断の有用性が示唆された. TUS の深達度診断においては気管支軟骨の同定が最も重要である. 気管支壁の軟骨は第 3, 4, 5 層の高, 低, 高輝度エコーとして比較的明瞭に描出され同定は容易であった.

SPUR に限局する病変は接線方向に超音波が当たするため, 軟骨との位置関係を把握することが困難であった.

TUS は病変の 1 断面を見る傾向が強く, 連続的に多くの断面を観察する必要があると考えられた.

## 結 語

TUS の胸部 X 線無所見肺癌に対する深達度診断の有用性が強く示唆された.

## 文 献

- 1) Nagamoto N, Saito Y, Suda H, et al. Rela-

tionship between length of longitudinal extension and maximal depth of transmural invasion in roentgenographically occult squamous cell carcinoma of the bronchus (nonpolypoid type). *Am J Surg Pathol* 1989; **13**: 11-20.

- 2) Nagamoto N, Saito Y, Ota S, et al. Relationship of lymph node metastasis to primary tumor size and microscopic appearance of roentgenographically occult lung cancer. *Am J Surg Pathol* 1989; **13**: 1009-1013.
- 3) Saito Y, Imai T, Nagamoto N, et al. A quantitative cytologic study of sputum in early squamous cell bronchogenic carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 1988; **10**: 365-370 1098-1103.
- 4) 佐川元保, 高橋博人, 栗本典昭・他. 気管支鏡による超音波検査. (人見滋樹監修), 金芳堂, 京都, 1-77, 1999.
- 5) 高橋博人, 佐川元保, 佐藤雅美・他. 細径プローブを用いた経気管気管支超音波内視鏡の気管支内外病変診断応用への試み. *気管支学* 1997; **19**: 189-194.
- 6) 高橋博人, 佐川元保, 佐藤雅美・他. 経気管気管支超音波内視鏡 (TUS) による末梢性肺野病変の観察. *日呼吸会誌* 1998; **36**: 857-863.
- 7) Fujimura S, Sakurada A, Takahashi H, et al. A therapeutic approach to roentgenographically occult squamous cell carcinoma of the lung. *CANCER Supplement* 2000; **89**: 2445-2448.

—— Neurocardiology Workshop: 第1回 Neurocardiology Workshop 奨励賞 ——

## 人工心臓の動脈圧反射制御

山 家 智 之

東北大学加齢医学研究所 病態計測制御研究分野



### 1. 緒 言

この原稿を執筆している現在、医学部附属病院では、開心手術後の一人の重症心不全患者に対して左心バイパス型の空気圧駆動型補助人工心臓が適応され、全身循環が良好に維持されている。移植法案が成立した後、

本邦においても待望久しかった心臓移植の臨床が具体化し、何例かの脳死移植が行われ、多くの患者さんが社会復帰するようになった。移植医療の具現化に伴って、心臓移植までの橋渡しとしてのブリッジユースとして、人工心臓の役割もまた見直されつつある。

現在本邦において臨床応用され保険請求が認められているのは、東北大学でも開発試験に協力してきた日本ゼオン社製のサック型補助人工心臓と、国立循環器病センターで開発されたダイヤフラム型補助人工心臓の二種類である。両者とも空気圧駆動型で、そもそも心臓手術後の一過性の低心拍出量症候群の治療のために開発されたものであり、長期使用を目的とするものではなかった。短期間の循環補助を目的としてきたので、空気圧駆動型補助人工心臓の宿命として、空気圧駆動ラインで小型冷蔵庫ぐらいの駆動装置から離れることは出来ず、多くの場合、ICUで寝たきりの生活を強いられる形となることが多い。周知のように本邦では、ドナーとなる心臓提供者が速やかに発生することは期待できない現状なので、必然的に移植待機期間は増加する一方である。その長い移植待機期間中、現実問題としては待機患者の退院は困難である。

このような状況を打開し、補助人工心臓が装着された患者さんを退院させて社会復帰させるべく、超小型で埋め込み可能な補助人工心臓を目指して様々なアプローチによる開発が進められている。

### 2. 埋め込み型人工心臓開発

欧米でも現在まで完全埋め込み型の補助人工心臓の開発が試みられているが、端的に言って欧米の補助人工心臓は日本人の体内に埋め込むには大きすぎるといふ批判は多い。そこで、日本人のような東洋人に体内に埋め込み可能なデバイスの開発を目指して様々なアプローチが試みられている。

拍動型を選択する限り、心室にあたるポンピングチャンバーと駆動メカニズムを埋め込み部に含有しなくてはならないのでいずれから小型化には限界がある。この限界を打破するには原理的には二つの方法論が有り得る。

一つは、無拍動ポンプの開発である。ロータリーポンプやスクリーポンプなら、心室が不要なので小型軽量化は比較的容易である。図1に東北大学で北海道大学・慶応大学と共同で開発中の軸流ポンプを提示する。教室で行われた動物実験で十分な左心補助効果が確認されている。

理論的なもう一つの方法論は、周波数を増加させる

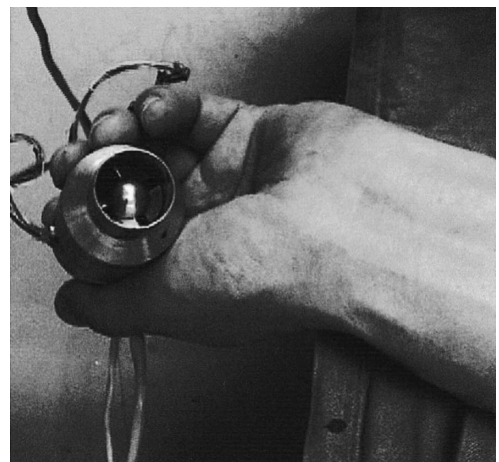


図1. 開発中の軸流ポンプ型完全埋め込み式補助人工心臓



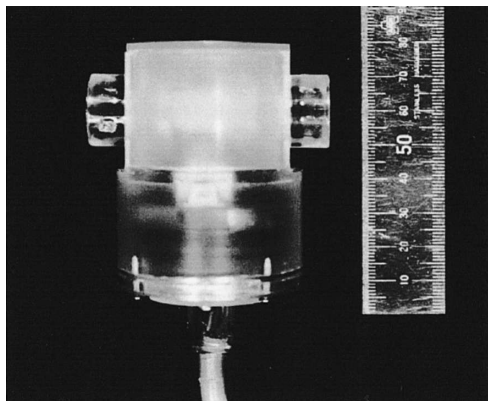


図2. 拍動周波数を増加させることにより小型軽量化を具現化した振動流型埋込み式補助人工心臓

ことである。図2に東北大学で発明され特許を保持する振動流ポンプの写真を提示する。重量270gと世界最軽量級の補助人工心臓であり、生体の心臓の周波数の周波数の10-50倍で振動するので、ポンピングチャンバーの縮小がシステムの飛躍的小型化を可能にした。また原理的に容積型なので、駆動様式によっては拍動を形成することも比較的容易である。

これらの人工心臓は無拍動流、高速振動流と言った生体には存在しないような血流波形を作り出すことによって小型化を具現化しているの、心臓として機能させるには、心臓のような制御メカニズムが必要にな

る可能性がある。

### 3. 人工心臓制御

生体の心臓が神経性体液性制御システムによって精密な制御を受けている事実は生理学の授業で習ったとおりであるが、人工心臓がこれらの制御メカニズムから独立であることは人工心臓開発の当初から着目する研究者は多かった。特に最近小型軽量化の観点から注目されつつある図1に様な無拍動流型人工心臓の開発に伴って、脈圧のない血流で循環を保つことが出来るかが問題になるだけでなく、完全な定常流では需要に応じて臓器間の血流配分を制御していけるのかについても流体素子の観点から疑問が提示されている。

脈がない。と言う状態が生理的循環といえるかどうか？

更に生体の制御機構から独立な人工心臓は生理的に許されるのか？ これまでにも様々な方面からの研究が行われている。そこで、我々は、生理学的に最も重要な反射機構である血圧反射システムを備えた人工心臓制御の実験を山羊の完全人工心臓を用いて行っている。その結果、非線形力学の分野で有名になりつつあるカオス理論の観点から興味深い現象が観察された。

図3に、人工心臓の制御を最低限の要素、人工心臓の最適制御と左右流量バランスを保持するだけのコン

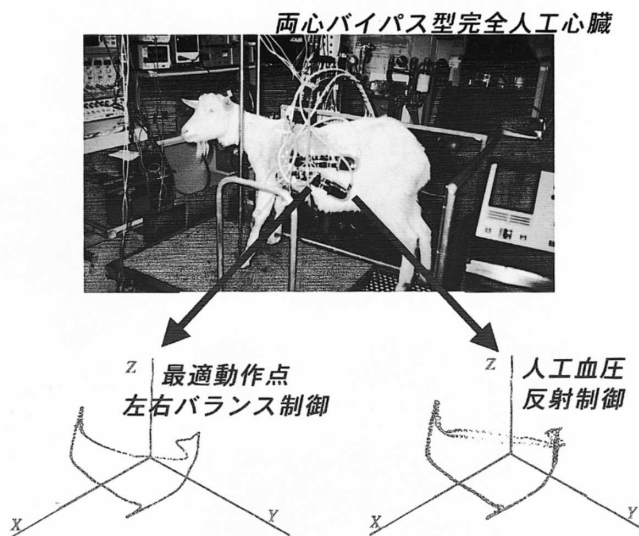


図3. 両心バイパス型完全人工心臓と、血行動態時系列曲線を高次元位相空間に埋め込んで再構築したストレンジアトラクタ。左は人工心臓の最適動作点左右バランス制御時の血行動態アトラクタ、右は血圧反射制御によって得られたストレンジアトラクタ

トロールを行うと、左のような典型的なリミットサイクルアトラクタが人工心臓の拍出曲線から形成される。これに対して、血行動態情報をフィードバックする血圧反射制御を加えると、アトラクタが複雑化し、右図のようにストレンジアトラクタが形成されている。リアプノフ指数解析及びフラクタル次元解析、KS エントロピー解析などの定量化によってカオスのダイナミクスに特徴的である鋭敏な初期値依存性とフラクタル的構造が確認され、血圧反射によって構成されるカオス性が示唆される結果となった。

血圧反射制御のような簡単なフィードバック制御を完全人工心臓に加えることによってカオスが発生する現象は興味深い結果と考えられる。

このような人工臓器を用いた新しいアプローチの方法論から、生体におけるカオスのダイナミクスの起源やその臨床的な意義付けについて新しい知見が得られることが期待される。

## 文 献

- 1) Matsuda, H., Fukushima, N., Sawa, Y., Nishimura, M., Matsumiya, G., Shirakura, R. (1999) First brain dead donor heart transplantation under new legislation in Japan. *Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **47**, 499-505.
- 2) Yambe, T., Yoshizawa, M., Tabayashi, K., Nita, S. (2000) Searching for the origin of chaos. In: *Nonlinear biomedical signal processing. Dynamic analysis and modeling*, Volume 2, (M. Akay, ed.) IEEE press, New York, pp. 40-71 83.
- 3) Yambe, T., Owada N., Tanaka, A., Kobayashi, S., Nanka, S., Fukuju, T., Tabayashi, K., Yoshizawa, M., Hashimoto, H., Nitta, S. (2000) Totally implantable ventricular assist system which can increase the brain blood flow. *Artif Organs*, **23**: 644-647.
- 4) Yambe, T., Yoshizawa, M., Abe, K., Tanaka, A., Takeda, H., Nitta, S. (1998) Making chaos with an artificial heart system. *Proceed for 20th Conferences IEEE EMBS*: 1561-1564, (in CD ROM).
- 5) Yambe, T., Nanka, S., Kobayashi, S., Tanaka, A., Owada, N., Yoshizawa, M., Abe, K., Tabayashi, K., Takeda, H., Nitta, S. (1999) Detection of cardiac function by the fractal dimension analysis. *Artif Organs*, **23**: 751-756.
- 6) Yambe, T., Nanka, S., Kobayashi, S., Tanaka, A., Owada, N., Yoshizawa, M., Abe, K., Tabayashi, K., Takeda, H., Nitta, S. (1999) Vagal nerve activity in the awake condition for the control of an artificial heart system. *Artif Organs*, **22**: 529-533.
- 7) Yambe, T., Kawano, S., Nanka, S., Kobayashi, S., Tanaka, A., Owada, N., Yoshizawa, M., Abe, K., Tabayashi, K., Takeda, H., Nishihira, T., Nitta, S. (1999) Peripheral vascular resistances during total left heart bypass with an oscillated blood flow. *Artif Organs*, **23**: 747-750.

— European Association of Nuclear Medicine Congress 2000 :  
Poster Session Award “CUM LAUDE” —

## [<sup>18</sup>F] 標識した新しい 2-nitroimidazole 誘導体, [<sup>18</sup>F] FRP170 による虚血心筋中生存域の検出

Detection of the ischemic but viable myocardium using a new  
[<sup>18</sup>F] labeled nitroimidazole analog ; [<sup>18</sup>F] FRP170

金田 朋洋<sup>1</sup>, 高井 良尋<sup>1</sup>, 加賀谷 豊<sup>2</sup>  
山根由理子<sup>2</sup>, 和田 裕明<sup>3</sup>, 結城 雅弘<sup>3</sup>  
岩田 鍊<sup>3</sup>, 井戸 達夫<sup>3</sup>, 辻谷 典彦<sup>4</sup>  
丸岡 伸<sup>1</sup>, 高橋 昭喜<sup>1</sup>, 山田 章吾<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院 量子治療学・量子診断学分野

<sup>2</sup>東北大学大学院 循環器病態学分野

<sup>3</sup>東北大学 CYRIC 核薬学研究部

<sup>4</sup>ポーラ化成工業



### はじめに

近年、虚血性心疾患の治療法として血管カテーテルや手術による血行再建術が一般的となりつつある。それに伴い治療法選択の基準として虚血心筋の正確な viability 評価が求められてきている。その際心臓核

医学検査が施行されることが多いが、従来の血流イメージングで分かることは心筋内の血流分布であり、血流（酸素）の需要と供給のバランスが崩れた虚血という病態を正確に評価しているとは言い難いと考えられるようになってきた。近年多く用いられている脂肪酸代謝や糖代謝イメージングによる評価は、より正確に虚血による心筋代謝の変化を評価できるが、全身の代謝状態に結果が大きく左右されやすいという欠点を有する。現在、虚血心筋の viability 評価に関する gold standard は [<sup>18</sup>F] FDG (fluorodeoxyglucose) による positron emission tomography (PET) 検査と言われている。これは心筋が虚血により低酸素となり、本来の好気性脂肪酸代謝から嫌気性糖代謝に移行した部位に FDG が強く集積する性質を利用している。そのため心筋の虚血生存域を高集積域として描出でき、血流イメージングのような病変部を低集積域として表示す

る画像に対して、視覚的にも非常に評価しやすい画像が得られる。しかし糖代謝は全身の状態に左右されやすく絶食や糖負荷といった条件が必要となり、さらに虚血性心疾患の大きなリスクファクターである糖尿病患者で評価が困難になるという大きな欠点を有する。

さて、今回用いた RP170 は 2-nitroimidazole 類に属し、悪性腫瘍中の低酸素細胞に対する放射線感受性増感剤としてポーラ化成工業で開発された比較的新しい薬剤である。これの [<sup>18</sup>F] 標識に東北大学 CYRIC 核薬学研究部で成功した。Nitroimidazole が低酸素細胞に選択的に集積する機序の全ては解明されていないものの、おおそ以下のように考えられている。Nitroimidazole は細胞内に主として拡散により入り、そこで還元酵素の働きを受ける。酸素の豊富な正常細胞内では再び酸化されて細胞外へ wash out されているが、低酸素細胞内ではさらにニトロ基の還元が進み、細胞内因子に接着したり細胞膜透過性の悪い物質に変化したりして細胞内に停滞する。これは同時に、細胞膜の崩壊した壊死細胞ではこのような機序は働かず、nitroimidazole は停滞しないことを意味する。つまり虚血域中で nitroimidazole の強く集積する部位は未だ壊死に陥っていない生存域であると言える。こういった nitroimidazole の性質を利用して、放射性標識により虚血心筋を画像化する試みは以前からなされてきた。当初は脂溶性を高くした方が心筋細胞内への集積が増し画像化に適すると考えられていたが、これは

同時に肝細胞への集積増加や、腎臓からの排泄が遅れることによる血中半減期の遅延を引き起こし、かえって周囲とのコントラストを低下することが分かってきた。そのため現在では脂溶性を低下させ水溶性を増した薬剤の開発が盛んになっている。RP170 は脂溶性の低下に成功した nitroimidazole 誘導体の一つである。脂溶性の指標である分配係数は misonidazole や BMS181321 に比して低く、脂溶性が低いことを意味する。 $^{18}\text{F}$  標識に伴う脂溶性の変化は未だ検討されていないが、 $^{18}\text{F}$  FRP170 も脂溶性が低いことが期待され、コントラストの良好な画像が期待できる。我々はラット心筋虚血モデルを作成し、二核種オートラジオグラフィの手法により虚血心筋の画像化を試みた。 $^{18}\text{F}$  FRP170 イメージと血流、脂肪酸代謝、糖代謝イメージとの比較を行い、糖代謝との比較に際しては糖尿病モデルを用いた検討も行った。尚、2000 年 9 月に Paris で開催されたヨーロッパ核医学会では血流との比較について発表したので以下に報告する。

## 方 法

Wistar rat 8 週齢♂をペントバルビタール投与により麻酔し、挿管して人工呼吸下に置いた。開胸後、左冠動脈結紮により心筋虚血モデルを作成した。冠動脈結紮後 30 分で  $^{18}\text{F}$  FRP170 を静注し、さらに 15 分後に血流イメージング製剤としての  $^{14}\text{C}$  Iodoantipyrine (IAP) を静注し、と殺した。心臓を摘出しドライアイスパウダーにて凍結後、20  $\mu\text{m}$  で薄切し、イメージングプレートにコンタクトした。1 時間のコンタクト後 Fuji Film 社製 BAS5000 で読み取り、 $^{18}\text{F}$  +  $^{14}\text{C}$  の画像を得た。但し 1 時間では  $^{14}\text{C}$  のイメージは得られないことは確認しており、これは  $^{18}\text{F}$  FRP170 のイメージとして良いと思われる。その後 20 時間以上かけて  $^{18}\text{F}$  の十分な減衰を待った後、再度イメージングプレートに 1 週間コンタクトして  $^{14}\text{C}$  IAP による画像を得た。左室壁に全周性に小さな ROI を取り、profile curve を描いた。この際、今回の虚血モデルでは中隔は障害されないため、中隔の平均カウントを 100% として normalize している。

## 結 果

血流イメージでは正常部（中隔）の集積が最も強く、障害される自由壁に近づくにつれて集積が低下する。 $^{18}\text{F}$  FRP170 のイメージでは血流の軽度低下している部位で、正常部よりも集積が上昇する。極度に血流

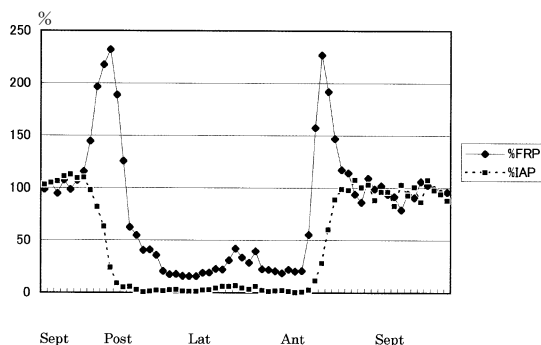
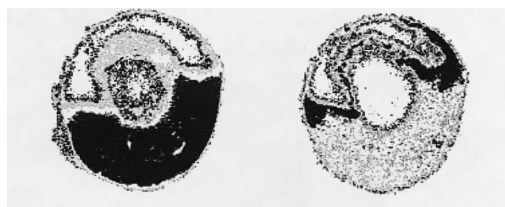


図. 上

左側の血流イメージでは正常部（中隔）の集積が最も強く、障害される自由壁に近づくにつれて集積が低下する。右側の  $^{18}\text{F}$  FRP170 のイメージでは、血流の軽度低下している部位で正常部よりも集積が高くなる。極度に血流低下している自由壁中央では  $^{18}\text{F}$  FRP170 の集積も低下する。

図. 下

左室壁全周性に連続性に小さな ROI を取り、中隔の activity を 100 として normalize し profile curve を描いた。血流が低下し始める部位とほぼ同位置で  $^{18}\text{F}$  FRP170 の集積が上昇し始め、最高で正常部位（中隔）の 2 倍以上に達している。血流が極度に低下した部位では  $^{18}\text{F}$  FRP170 の集積も低下している。

低下している自由壁中央では  $^{18}\text{F}$  FRP170 の集積も低下する（図. 上）。

profile curve で検討すると、血流製剤の activity が低下し始めるとほぼ同位置で  $^{18}\text{F}$  FRP170 の集積は上昇し始めることが確認された。血流製剤の activity が極度に低下した重度虚血域においては  $^{18}\text{F}$  FRP170 の集積も低下している（図. 下）。

## ま と め

血流製剤との比較で  $^{18}\text{F}$  FRP170 が軽度血流低下域で集積亢進していたことは、nitroimidazole が壊死組織に停留しないという薬物動態から考えて、虚血域中の生存域を hot spot として描出できたことになる。

心筋虚血における生きている (viable) 細胞の検出は、臨床的に治療方針決定に直接関与する。これらが

検出された際には、侵襲の高い血行再建術の積極的な適応となり、逆に検出されない場合には保存的に非侵襲的な治療方針が選択されるであろう。 $^{18}\text{F}$  FRP170 は  $^{18}\text{F}$  で標識しているため感度・定量性の優れた PET study が可能である。さらに、その後の検討により deoxyglucose よりも虚血生存域に対する感度が高く、また糖尿病モデルでも deoxyglucose のような大きな影響を受けないことが立証されつつあり、

$^{18}\text{F}$  FRP170 は  $^{18}\text{F}$  FDG と替わって虚血生存域検出に関する gold standard となり得る可能性を有する。

## 謝 辞

本研究は財団法人医用原子力技術研究振興財団による助成のもとに行われた。記して感謝の意を表する。

— ESPEN: Young Investigator Award —

## The Effect of L-Valine on Promoting the Growth of the Small Intestinal Mucosa was Almost Equal to That of L-Glutamine

高 橋 雄 大

東北大学大学院医学系研究科 外科病態学講座 先進外科学分野



### はじめに

腸管は栄養を効率よく体内に取り込むための消化・吸収を行うだけではなく、病原体などの外界からの異物の侵入を防ぐためにリンパ組織が最も発達している免疫臓器でもある。よって腸管が機能破綻することは極度の栄養障害や重篤な病態を引き起こすと考えられる。腸粘膜増殖に分岐鎖アミノ酸 (BCAA) は効果があるとの報告があるが、個々の BCAA で検討した報告は無い。以前より当科では、L-Valine (Val) が 70% 肝切除モデルラットにおいて肝再生促進効果を有することを証明してきた。更に  $^{14}\text{C}$ -Val を用いた Macro Autoradiography では、Val が小腸へも特異的に取り込まれていたことから、小腸に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。そこで本実験では抗癌剤の 1 つである 5-fluorouracil (5-FU) をラットに投与する代表的な小腸粘膜障害モデルを作成し、Val を添加した中心静脈栄養輸液 (TPN) の投与による腸粘膜再生・増殖効果の有無を検討するとともに、小腸粘膜増殖作用を有する glutamine (Gln) と比較したので報告する。

### 実験方法

Crj; Donryu rat (雄性, 8 週齢) の右頸静脈からシリコンカテーテルを挿入し、上大静脈 (前大静脈) に留置。カテーテル末梢側は、皮下を通し肩甲骨間から体外へ出し、スーベルを経て持続注入ポンプへ接続した。輸液馴化を約 18 時間行った後、下記に示す TPN を群ごとに施行した。また、カテーテル挿入直後に、5-FU を 40 mg/kg の割合で隔日 3 回腹腔内へ投

与し、5-FU 誘発腸炎ラットを作製した。実験期間中は絶食とし、水分のみ自由摂取とした。TPN は総合アミノ酸製剤にブドウ糖液、電解質、ビタミン剤、微量元素、抗生剤を混ぜて作製し、これを Control TPN (Cont 群;  $n=5$ ) とした。この Cont. TPN に Val を添加し Val 濃度を 0.86% に調整した Val TPN (Val 群;  $n=7$ )、もしくは Alanyl-Glutamine を添加し Gln 濃度として 2% に調整した Gln TPN (Gln 群;  $n=9$ ) を投与し、5-FU 誘発腸炎ラットに対する腸粘膜への Val, Gln の影響を検討した。6 日目に採血、放血犠死後、空腸 (Treitz 靱帯から 5 cm 肛門側) と回腸 (回盲部から 5 cm 口側) を約 2 cm ずつ採取し、H-E 染色を施行。絨毛高、絨毛幅、クリプトの深さ、表面積を測定した。さらに、標本採取後の残存小腸粘膜も採取し、粘膜湿重量、蛋白量、アミノ酸量を測定した。

### 結 果

組織学的には、Cont 群は絨毛の平底化、クリプトの減少を認めた。それに対し、Val 群と Gln 群は絨毛が増加し、Goblet cell も多数存在していた。浮腫など異常所見は認めなかった (図)。

空腸の絨毛高・表面積は、Cont 群に対し、Val 群と Gln 群は有意 ( $p<0.05$ ) に増加していた (表)。表面積も同様に、Cont 群に対し、Val 群と Gln 群は有意 ( $p<0.05$ ) に増加していた。

回腸絨毛高は、Cont 群に対し Val 群では有意差を認められなかったものの、高値をとる傾向を示した ( $p=0.08$ )。Gln 群は Cont 群に対し有意 ( $p<0.05$ ) に増加していた。表面積においては、3 群間で有意差は認めなかったが、Cont 群に対し、他の 2 群は高値を示す傾向が見られた。

粘膜質重量は、Cont 群に対し、Val 群と Gln 群は有意 ( $p<0.05$ ) に増加していた。

表. 小腸絨毛高, 表面積, 粘膜湿重量および粘膜内蛋白量 ( $\mu\text{mol/dl/g} \cdot \text{mucosa}$ ) を平均値 $\pm$ 標準偏差で表わした  
Scheffe 法で多重比較を行ない,  $p < 0.05$  を有意差ありとした

	Cont 群	Val 群	Gln 群
空腸絨毛高 ( $\mu\text{m}$ )	197.65 $\pm$ 23.82	※ 362.69 $\pm$ 24.48	※ 369.12 $\pm$ 56.64
空腸表面積 ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ )	67.86 $\pm$ 15.99	※ 124.39 $\pm$ 20.70	※ 113.97 $\pm$ 19.45
回腸絨毛高 ( $\mu\text{m}$ )	205.48 $\pm$ 19.83	254.12 $\pm$ 39.96	※ 269.41 $\pm$ 56.05
回腸表面積 ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ )	54.51 $\pm$ 13.15	67.86 $\pm$ 10.20	66.59 $\pm$ 25.68
粘膜湿重量 (mg/cm)	27.70 $\pm$ 2.95	※ 36.77 $\pm$ 5.06	※ 34.45 $\pm$ 4.23
粘膜内蛋白量	366.18 $\pm$ 64.38	※ 485.07 $\pm$ 45.09	※ 456.38 $\pm$ 62.99

mean $\pm$ SD ※  $p < 0.05$  vs Cont 群

また粘膜内蛋白量は, Val 群と Gln 群は Cont 群に比べ有意 ( $p < 0.05$ ) に増加していた。

## ま と め

5-FU 誘発腸炎ラットに対して, 高濃度 Val TPN を投与すると, 腸粘膜再生・増殖効果を有し, Val 濃度が Cont TPN の 4 倍のとき最も効果的であることが初めて証明された。この効果は Gln と同等であった。しかし Gln は難溶性であり, 仮に溶けたとしても不安定である。そこで dipeptide 形の Alanyl-Glutamine が開発されたが, 製造コストが高いこと, Gln の効果的な濃度である 1~4% となるように Alanyl-Glutamine を添加すると, 現在用いられている輸液製剤と比べ必須アミノ酸の相対的低下をきたし, いわゆるアミノ酸インバランスの状態になることが懸念されるなどの理由で, 開発中止となった経緯がある。Val は Gln と違い水溶性であること, 安定性があること, 安価であることなどの点から, 経口摂取不能な重篤な患者に対しても静脈内投与が可能であり, 臨床応用が十分可能であると考えられる。

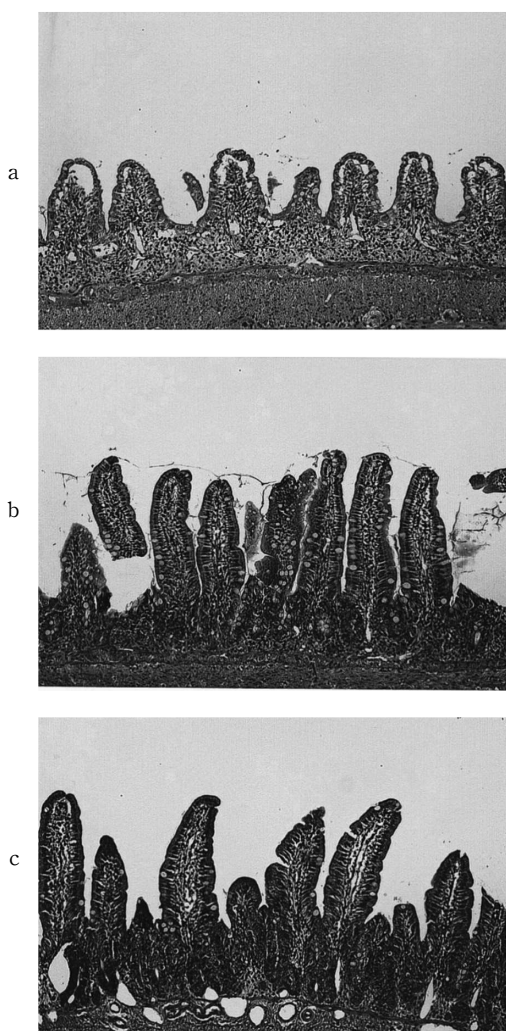


図. 5-FU 誘発腸炎ラットに対する TPN 施行時の空腸組織像。H-E 染色 100 倍

a; Cont 群 b; Val 群 c; Gln 群

—— 日本脂質栄養学会：日本脂質栄養学会ランズ学術賞 ——

## 3 型プロスタノイドの超微量定量法の確立とその臨床応用

水柿 道直, 菱沼 隆則

東北大学医学部附属病院 薬剤部



アラキドン酸 (AA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの高度不飽和脂肪酸から、アラキドン酸カスケードにより生成されるプロスタノイドは強力な生理活性を示すために、その産生異常は多くの疾患の発症や病態の変化と密接に関わることが知られてい

る。

魚油中に多く含まれる n-3 系不飽和脂肪酸の EPA は、n-6 系 AA 由来の 2 型プロスタグランジン (PG) より n-3 位に二重結合を一つ多く有する  $\text{PGI}_3$  やトロンボキサン  $\text{A}_3$  ( $\text{TXA}_3$ ) 等の 3 型 PG に変換され、動脈硬化や心筋梗塞等の血栓性疾患にかかわる生理作用を示す。

しかしながら、PG の多くは産生量が微量であるうえ、活性体自身が不安定であるため、その量的実態は明らかではなく、その動態及び生理的意義の解析には代謝物の質的量的変動を的確に把握することが不可欠となる。

我々は AA 由来の 2 型 PG 代謝物と、それまで報告例の乏しかった EPA 由来の 3 型 PG 代謝物のガスクロマトグラフィー—質量分析装置 (GC-MS) を用いた超微量定量法を確立し、培養細胞及びヒトにおける 2 型・3 型 PG の産生量を明らかにするとともに、疾患との関連性を検討し、以下の成果を挙げた。

## 3 型 PG の超微量分析法の開発

PG の血中及び尿中代謝物には多くの同族体や異性体が存在するため、化合物選択性に優れ、構造類似体の一斉分析を可能とする検出法が必要になる。そこで特異性と選択性に優れるガスクロマトグラフィー—選択イオン検出 (GC-SIM) 法により、PG 関連物質の微量定量法の検討を行った。内標準物質としては、測定

精度の向上をはかるため、測定対象の  $^{18}\text{O}$  標識体を新規に調製した。さらに、EPA 由来の 3 型 PG 等入手困難な標品は、生物変換系を構築して新規に調製した。誘導体化には、メトキシアミンあるいはプロピルアミンを用いた開環反応を応用し、さらにシリル化剤として安定性に優れるジメチルイソプロピルシリルイミダゾールを用いた。生体試料からの分離・精製は、ODS やシリカゲルカラムを用いたカラムクロマトグラフィーのみで行うことにより、短時間での実施を可能にした。

以上の操作を、トロンボキサン (TX) 代謝物の  $\text{TXB}_2$ , 11-dehydro- $\text{TXB}_2$  及び  $\text{TXB}_3$ , プロスタサイクリン (PGI) 代謝物の 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ , 2, 3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$  及び  $\Delta^{17}$ -6-keto-PGF $_{1\alpha}$  さらに、PGE $_1$ , PGE $_2$  及び PGB $_1$  等の定量に応用した。設定した各化合物のモニタリングイオンピークは、いずれも S/N 比高く検出され、10 pg-100 ng の範囲で定量可能であった。その検出限界は 10 pg (S/N $\geq$ 10) 以下であった。さらに、3 型 PG についてはその構造特異性を考慮し、モデル化合物である *cis*-3-hexen-1-ol に対するモノクローナル抗体を調製し、その抗体カラムによるバイオアフィニティーを利用した濃縮・精製法を確立して、定量法の高感度化を可能にした。

また、これらの方法を応用して  $\text{TXA}_3$  の尿中主要代謝物である 11-dehydro- $\text{TXB}_3$  やその  $\beta$  酸化体を新たに同定した。

尿中安定代謝物の分析は、試料採取に患者の苦痛をとまわず、採血等侵襲の刺激に起因する人工的な PG 産生量の増加がない、などの利点を有するため臨床への応用が容易であり極めて有用である。

## 試験管内 2 型・3 型 TX 産生評価系

TX 産生能の知られる、赤白血病由来 HEL 細胞を用いた検討から、 $\text{TXB}_3$  の産生量は  $\text{TXB}_2$  に比して極微量であるが、EPA の添加によりその産生量は増加することを明らかにした。



また、EPA 及び DHA の長期添加効果の検討から、EPA 及び DHA 添加により細胞中のこれら脂肪酸の含量が増加し、EPA 添加時には 3 型 TX, DHA 添加時には 2 型・3 型 TX の産生量が増加することを見いだした。これらは、細胞内における DHA から EPA の逆変換の可能性あるいは TX 産生系への何らかの誘導作用を有することを示すものである。

### ヒトにおける 3 型 PG 産生量の検討

1. EPA 摂取時の 3 型 TX の産生：健康人 6 例の 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> 及び 11-dehydro-TXB<sub>3</sub> 量の平均値はそれぞれ 1,457 (pg/mg creatinine), 4.31 (pg/mg creatinine) であった。EPA 摂取後の TX 産生量の経時変化を検討すると、2 型 TX に変動は認められなかったが、3 型 TX は増加した。また、DHA 摂取時にも 3 型 TX の産生が増加したが、その産生量の変化は EPA 摂取時に比して、遅い時期に認められた。DHA 摂取時には 2 型 TX の変動も観察され、EPA 摂取時の 3 型 TX の産生量の増加と、DHA の EPA への逆変換の可能性を示した。

2. EPA 摂取時の 3 型 PGI の産生：EPA 摂取前の血漿中 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, Δ<sup>17</sup>-6-keto-PGF<sub>1α</sub> の平均値はそれぞれ 196.5, 19.4 pg/mL であり 3 型は 2 型の約 10 分の 1 であった。2 週間摂取時には、6-keto-PGF<sub>1α</sub>, 血清コレステロール値、中性脂質等には変動は認められなかったが、Δ<sup>17</sup>-6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量は増加し、うち 2 例では約 3 倍の値を示した。さらにこの上昇は摂取中止後 2 週間で摂取前の値に回復した。以上、健康人の血中 PGI<sub>3</sub> 量は 2-75 pg/mL 程度であること、またその含量は EPA 摂取に伴い、選択的に増加することを明らかにした。

3. 糖尿病との関連性：糖尿病患者血清の PGI 産

生に及ぼす影響について検討した。その結果、血管内皮細胞の 2 型及び 3 型 PGI 産生能は、糖尿病患者血清の添加により、健康人血清添加時に比して有意に低下するが、糖尿病患者血清と EPA を同時に添加すると、PGI の産生量を健康人血清添加時のレベルに維持できることを見出した。また、ヒト血漿中の PGI 含量を検討して、EPA の摂取により 3 型 PGI が増加することを確認し、3 型 PGI 産生量の増加が EPA の抗血小板凝集作用や抗動脈硬化作用の一因であるとする従来からの仮説を実験的に証明することができた。この事実より、EPA が血栓性の合併症を誘発する糖尿病患者の治療に有効であることが示された。

### 結 語

不安定な PG の特徴的な代謝物を選択し指標とすることにより、2 型・3 型 PG の定量的解析が可能となり、それらの量的バランスの解析も可能となった。強力で多様な生理活性を示す PG の解析は、脂肪酸の生理的意義の解明や疾患との関連性を明らかにする上で、重要である。この PG 代謝物の質的量的変動の解析を基盤として脂肪酸、特に n-3 系脂肪酸摂取の栄養学的意義の解明と疾病の診断・治療、薬効のモニタリングさらには疾病の予防に精力的に応用してゆきたい。

### 謝 辞

本研究の遂行にご協力頂きました鈴木研一博士、石橋正兀博士並びに、研究室の職員、学生諸氏に厚く御礼申し上げます。

本稿は脂質栄養学、10、5-10、2001 に掲載されたランズ学術賞受賞研究総説の要約である。

—— 第 38 回日本癌治療学会総会：第 38 回日本癌治療学会総会優秀演題賞 ——

## 新しい有機アニオントランスポーターLST-2 は消化器癌に 異所性に発現し，MTX 感受性を担う

小野川 徹，海野 倫明，近藤 典子  
安達 尚宣，藤原 耕，鈴木 正徳  
大谷 明夫\*，佐藤 永一\*，名倉 宏\*  
阿部 高明\*\*，松野 正紀

東北大学大学院医学系研究科 消化器外科学分野，\*病理形態学分野，\*\*分子血管病態学分野



### はじめに

肝臓は生体内で最も多様な代謝機能があり，血中からの内因・外因性物質を胆汁中へ排除する機構をもち，生体の恒常性を維持するのに欠くことのできない重要な臓器である．この機能は胆汁酸や各種薬物を含

めた有機アニオンとある種のカチオンの排出に深く関与している．この取り込み機構は  $\text{Na}^+$  依存性の  $\text{Na}^+$ /taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) と  $\text{Na}^+$  非依存性の organic anion transporting polypeptide (OATP) によって輸送されと考えられている．今日まで，われわれを初めとした幾つかのグループが，ラットにおける  $\text{Na}^+$  非依存性の有機アニオントランスポーター (oatp) 遺伝子群を単離してきた<sup>1)</sup>．その中でわれわれはラット oatp2, oatp3 を世界に先駆け単離・報告した<sup>2)</sup>．続いて，スイスのグループからホモログと思われるヒト OATP 遺伝子が単離された<sup>3)</sup> が，機能や発現でいくつかの矛盾点があることより，OATP 遺伝子とは異なる別のトランスポーター遺伝子が見つかどっている可能性が示唆されていた．

1999 年，われわれは，新たにヒト肝臓のみに局限して発現している有機アニオントランスポーター Human Liver Specific Organic Anion Transporter, LST-1 を単離した<sup>4)</sup>．さらにわれわれはラットのカウンターパート rlst-1 も単離し，その発現は胆汁鬱滞に関与することを明らかにした<sup>5)</sup>．LST-1 は 691 アミノ酸からなり，疎水性解析から 12 カ所の膜貫通領域を持

ち，ホモロジー解析から LST-1 は OATP 群とプロスタグランディントランスポーター (PGT) 群の中間に位置する新規遺伝子であることを明らかにした．Northern blot から LST-1 の mRNA はヒト肝臓のみに発現していた．

### 1. LST-2 の単離

われわれは LST-1 に相同性を有する他の OATP ファミリー遺伝子を探索する目的で，ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを LST-1 をプローブとして用いてスクリーニングしたところ，LST-1 と高い相同性を有する新規 cDNA を単離し，これを LST-2 と命名した．LST-2 は 702 アミノ酸からなり，12 回の膜貫通領域を持ち，そのアミノ酸配列は LST-1 と 79.7% と高い相同性をもっていた．樹形図解析から既知の OATP 群，PGT 群とは中程度の相同性を持ち LST-1 同様の独自のグループに属していた．

### 2. LST-2 の肝臓での発現

Northern blot から，ヒトでは LST-2 の mRNA も肝臓にのみ発現していた．しかしその相対的発現レベルは LST-1 の数十分の 1 であると推定された．LST-1 と 2 それぞれの細胞内 C 末の特異的アミノ酸配列に対するポリクローナル抗体を作製し，免疫組織化学的解析を行ったところヒト肝臓での LST-1 と LST-2 の区域的局在の相異と相対的発現レベルの相異が示された．すなわち LST-1 が肝小葉全体の肝細胞膜に存在するのに対して，LST-2 蛋白は中心静脈周囲の肝細胞膜にのみ局限していた．LST-2 の細胞局在をさらに検討するため，毛細胆管のマーカー CD13 と LST-2 の

蛍光二重染色を行った。LST-2は毛細胆管側ではなく、類洞側の肝細胞膜表面に発現していた。さらに肝臓における免疫電顕を行い、LST-2の発現が類洞側の肝細胞膜表面であることを確認した。

中心静脈は低酸素状態であり、低酸素下では幾つかの遺伝子発現が誘導されることが知られている。LST-2のゲノム配列を単離し、その上流域に低酸素反応部位の存在を確認した。これはLST-1ではなく、LST-2の中心静脈領域に局限した局在を説明できる可能性が示唆された。

### 3. LST-2の消化器癌での発現

LST-2のシーケンスを用いヒトEST data baseを検索したところ、LST-2の配列と同一のシーケンスが胃癌の印環細胞癌由来のcDNAにあることが判明した。そこで胃癌由来の培養細胞株各種でNorthern blotを行うと、LST-2のmRNAはNUGC-4やKATOIIIなどに発現していた。一方LST-1の発現は胃癌細胞では認められなかった。KATOIIIを用いた*in situ* hybridizationでもアンチセンス・プローブで陽性のシグナルを認めた。実際の胃癌手術標本でLST-2の発現を検討すると、約3分の1の症例に発現を認めた。さらにNorthern陽性の標本でLST-2の*in situ* hybridizationを行うと、癌細胞にのみ発現を認めた。他の臓器由来のヒト癌培養細胞株でも発現を検討した結果、LST-2は胃癌・大腸癌・膵癌など消化器固形癌細胞株で多く発現していた。一方、LST-1はHT-17という肝癌由来細胞にのみ発現していた。さらに後述するが、現在までメトトレキサート(MTX)を輸送することが知られている唯一のトランスポーターreduced folate carrier (RFC-1)は造血系細胞によく発現していた。胃癌を含めた実際の消化器癌におけるNorthern blotにてLST-2は胃癌8分の3症例、大腸癌5分の1症例、膵癌1分の1症例に発現を認めた。一方、LST-1やRFC-1の発現は認められなかった。またNorthern陽性の胃癌・大腸癌・膵癌症例について免疫組織化学的検討を行うと、それぞれの癌細胞にのみシグナルを認めた。さらにNorthern陽性の膵癌症例の転移リンパ節にも特異的シグナルを認めた。

### 4. LST-2の基質特異性の解析

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて各種薬物の取り込みを検討したところ、LST-2はLST-1と同様にタウロコール酸や甲状腺ホルモン、抱合型ステ

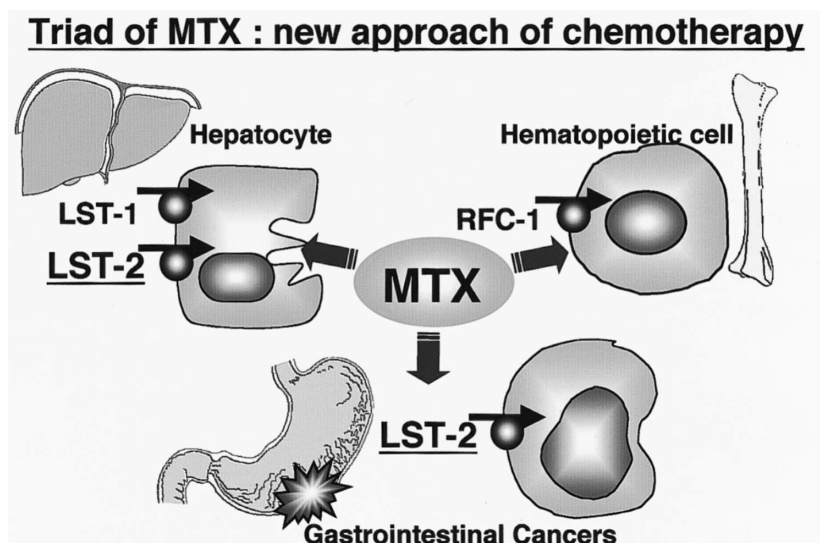
ロイドを輸送した。さらにLST-1、LST-2ともにMTXをMichaelis-Menten式に従い輸送することがわかった。

### 5. 培養細胞を用いたLST-2のMTX感受性の検討

MTXの取込みと細胞のMTXに対する感受性の関係を検討するため、LST-2を遺伝子導入したLST-2発現動物細胞株MDCK/LST-2を樹立した。この細胞はmock transfectantに比べ濃度依存性かつ飽和性にMTXを輸送し、そのKm値もアフリカツメガエル卵母細胞での検討と同程度の値であった。次にMTT assayでLST-2のMTXに対する感受性を検討した。MDCK/LST-2はmockと比較し有意にMTXに対する感受性、すなわちkilling効果が上昇した。また培地に競合的拮抗剤であるbromosulphophthalein (BSP)を加えることによりMTXの取り込みおよびkillingを阻害した。これより、LST-2の発現とMTXの感受性には相関があることが明らかとなった。さらに実際LST-2を発現している胃癌由来細胞株KATOIII、大腸癌由来のClone A、膵癌由来のPK-8のMTXの取り込みはBSPにより抑制され、またMTT assayによる感受性の検討でもBSPを共存させたときには有意にkillingが抑制された。以上よりLST-2が消化器固形癌においてMTXに対する感受性を決定しているトランスポーターであると結論づけた。

### おわりに

MTXは臨床場においては主に血液疾患に用いられているが、肝障害や消化器障害が副作用にあり、消化器固形癌へはあまり用いられていない。今回の検討の結果、現在までMTXを輸送する膜蛋白には3つあることが想定される。一つはRFC-1であり、造血系細胞でのMTXの感受性を決定するものと考えられた。一方、肝臓にはLST-1とLST-2があるが正常においてLST-1が優位に発現しているため、肝臓でのMTXの取り込みと肝細胞障害感受性は、主にLST-1が担っていると考えられた。さらに消化器固形癌においてはLST-2のみが強く発現していることから、MTXはLST-2に輸送され、抗癌剤として働くと考えられた。(図)現在のところ、LST-2特異的な輸送基質は明らかではないが、このようなLST-2特異的に輸送される抗癌剤の開発により、肝障害や骨髄抑制のない消



化器固形癌特異的な癌治療の確立がもたらされることが期待される。また、特異的基質の放射線標識体によるシンチグラフィーにより、転移巣検索への応用の可能性が示唆された。

のである。

## 文 献

- 1) B. Hagenbuch, B. Stieger, M. Foguet, H. Lubbert, and P.J. Meier *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; **88**: 10629-10633.
- 2) Abe T, Kakyo M, Sakagami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, Nomura H, Hebert S. C, Matsuno S, Kondo H, Yawo H. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 22395-22401.
- 3) E. Jacquemin, B. Hagenbuch, B. Stieger, A.W. Wolkoff, and P.J. Meier *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; **91**: 133-137.
- 4) Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Kondo H, Yawo H. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 17159-17163.
- 5) Kakyo M, Unno M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Iwasashi H, Nakai D, Seki M, Suzuki M, Naito T, Matsuno S, Yawo H, Abe T. *Gastroenterol.* 1999; **117**: 770-775.

## 謝 辞

本研究は、本学分子血管病態学分野阿部高明講師、病理形態学分野名倉宏教授、大谷明夫助教授、消化器外科学分野松野正紀教授、鈴木正徳講師、海野倫明助手の御指導のもとに、多くの先生方によりなされた共同研究であり、その先生方のお名前を記し、厚く御礼申し上げます。(敬称略)

阿部高明、鈴木健弘(分子血管病態学)・海野倫明、近藤典子、鹿郷昌之、安達尚宣、藤原 耕、渋谷恵美子、稲部景子、鈴木正徳、松野正紀(消化器外科学)・大谷明夫、佐藤永一、伊達文子、小野克則、名倉 宏(病理形態学)・椎葉健一、岡部光規(生体調節外科学)・西尾利之(小児病態学)・浅野直喜(消化器病態学)

## 付 記

本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認を得たも

—— 第 36 回日本胆道学会総会：第 2 回胆道学会賞原著部門 ——

## CDK inhibitor $p27^{kip1}$ を用いた遺伝子治療 —— 胆管癌への基礎的研究

片 寄 友

東北大学大学院医学系研究科 外科病態学 消化器外科学分野



### はじめに

胆管癌は局所浸潤性が高度で、近接した大血管に直接浸潤し切除不能となることが多い<sup>1)</sup>。われわれは切除不能胆管癌を対象として積極的に集学的治療を展開してきたが、延命効果は得られるものの、最終的に症例を失うことを数多く経験した。さらなる予後改善には、癌細胞を死滅させる強力な治療手段の開発が急務である。その意味から胆管癌に対する遺伝子治療が注目される所以である。

最近, cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI)  $p27^{kip1}$  は、乳癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、肝癌などの多岐にわたる腫瘍において予後規定因子であることが証明され、癌の増殖を制御する上で重要な分子と考えられている。

また、われわれは以前より  $p27^{kip1}$  に注目し、おなじ CDK inhibitor  $p21^{cip1}$  と比較し  $p27^{kip1}$  が強い細胞増殖抑制効果を示し<sup>2)</sup>、さらに乳癌細胞株、肺癌細胞株を用いた検討により  $p27^{kip1}$  を組込んだアデノウイルス (Adp27) がアポトーシスを誘導することを証明しており<sup>3)</sup> (図 1.A), 早くから  $p27^{kip1}$  が癌抑制遺伝子類似の機能を有することを提唱してきた。

一方、われわれの統計学的検討では、胆管癌の予後因子の一つとして組織型が関与しており、乳頭腺癌 (pap) が予後が良く、 $p27^{kip1}$  の発現を検討すると、乳頭腺癌 (pap) が低分化型腺癌 (por) より  $p27^{kip1}$  の発現が高い傾向が認められた (図 1.B)。

そこで、われわれは胆管癌に対するアデノウイルス  $p27^{kip1}$  (Adp27) を用いた遺伝子治療の基礎的研究を行うこととした。

### 方 法

腫瘍細胞株は当科で樹立した肝外胆管癌細胞株

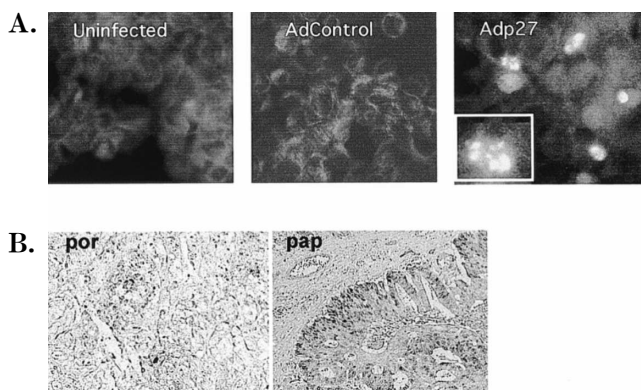


図 1. A. 乳癌細胞株 MB-MDA-231 を用いた TUNEL 法による核染色 (文献 3. より引用)。核の凝集, 断片化を認めアポトーシスが明らかである。B. 抗  $p27$  抗体による免疫染色。pap が強く染色され  $p27$  の発現が確認できた。

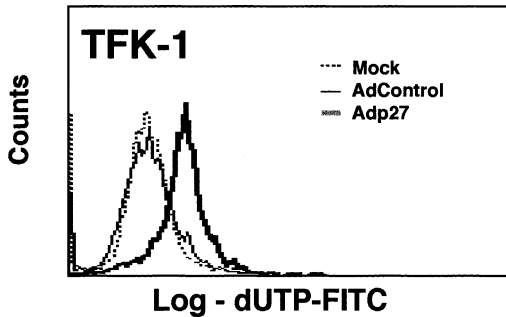


図2. TFK-1 に対して, 各ウイルスを 50 pfu/cell にて感染させ, 72 時間後全細胞を回収し, TUNEL 法にて染色しフローサイトメトリーにて測定.

(TFK-1)<sup>4)</sup>を用いた. アデノウイルスベクター-p27<sup>k<sup>ip</sup>1</sup>はアデノウイルスゲノム pJM17 から作製した<sup>2)</sup>. アポトーシスの検討には, TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)を用い, フロサイトメトリーで測定した.

## 結 果

### 1. アポトーシスの検討

フロサイトメトリーにより TUNEL を施行し, アポトーシスの存在を確認した. 胆管癌細胞株 TFK-1 について施行し, Mock および AdControl に比較し, Adp27 が右方シフトを認め DNA の断片化を示し, アポトーシスの存在を確認した (図2).

## 考 察

p27<sup>k<sup>ip</sup>1</sup> は 1994 年, Polyak らにより cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI) p21 ファミリの一つとしてクロニングされ, そのトランスジェニックマウスでは高度の発癌性および巨大化が観察されたことから, 細胞周期停止作用以外に癌抑制遺伝子的な機能を有することが示唆されていた. われわれは 1997 年, p27<sup>k<sup>ip</sup>1</sup> がアポトーシスを誘導することを証明し, 細胞周期停止以外に癌抑制遺伝子的な作用を有することを証明し, さらに乳癌培養細胞株を移植したヌードマウスにおいて著明な抗腫瘍効果を示すことから, p27<sup>k<sup>ip</sup>1</sup> による遺伝子治療の可能性を提唱してきた<sup>5)</sup>. 特筆すべきは, 乳癌細胞株では p27<sup>k<sup>ip</sup>1</sup> が p53 の野性型, 変異型にかかわらずアポトーシスを誘導することである. この性質を応用し, p53 の変異が少ない胆管癌にも応用できる可能性が示唆され, 胆管癌に対する p27<sup>k<sup>ip</sup>1</sup> を

用いた遺伝子治療について検討することにした.

Adp27 のアポトーシス誘導の証明については, フロサイトメトリー-TUNEL 法を用いて証明できた. 生理的な p27<sup>k<sup>ip</sup>1</sup> の機能に関しては, 抗癌剤, 放射線などの各種アポトーシス刺激に対して p27<sup>k<sup>ip</sup>1</sup> は, 抗アポトーシス作用を持つと言われているが, アデノウイルスを用いた過剰発現モデルではアポトーシス作用が明らかであった.

## 結 語

アデノウイルス p27<sup>k<sup>ip</sup>1</sup> が p53 の状況にかかわらずアポトーシスを誘導できる作用を持つことが優れており, 遺伝子導入の特異性の問題はあるものの, 胆管癌に広く応用できる可能性が示唆された. 今後, アポトーシスの機構を詳細に検討し, 胆管癌の生物学的特性を考慮した遺伝子治療の実現に向けて研究を進めていきたい.

## 謝 辞

本研究は, 「平成 11 年度 黒川利雄がん研究基金」のもとに行われ, 御指導頂きました本学外科病態学消化器外科学分野の松野正紀教授および鈴木正徳講師と, 直接実験に協力して頂いた同大学院生 山本久仁治先生に, 厚く御礼申し上げます.

## 文 献

- 1) Suzuki M, Takahashi T, Ouchi K, Matsuno S. The development and extension of hepatohilar bile duct carcinoma. A three-dimensional tumor mapping in the intrahepatic biliary tree visualized with the aid of a graphics computer system. *Cancer* 1989; **64**: 658-66.
- 2) Craig C, Wersto R, Kim M, Katayose D, et al. A recombinant adenovirus expressing p27Kip1 induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene* 1997; **14**: 2283-9.
- 3) Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin- dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997; **57**: 5441-5.
- 4) Katayose Y, Kudo T, Suzuki M, et al. MUC1-specific targeting immunotherapy with bispecific antibodies: inhibition of xenografted human bile duct carcinoma growth. *Cancer*

- Res 1996 ; **56** : 4205-12.
- 5) Rakkar AN, Li Z, Katayose Y, Kim M, Cowan KH, Seth P. Adenoviral expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 : a strategy for breast cancer gene therapy. J Natl Cancer Inst 1998 ; **90** : 1836-8.

— 日本薬学会：東北支部奨励賞 —

## 修飾核酸とがんとの関連性に関する研究

石 渡 俊 二

東北大学医学部附属病院 薬剤部



## 1. はじめに

RNA 中にはメチル化などの修飾を受けた修飾核酸が、90 種以上存在することが知られている。これらの修飾核酸は tRNA の機能発現などに関与することが報告されているが、その生理的機能の詳細は不明な点が多い。

これまでに、がん患者尿中に排泄される修飾核酸量は健常人と比較し高値を示すことが報告されてきた。水柿らは修飾核酸である 1-メチルアデノシン (m1Ado, Fig. 1) 及びシュドウリジン (PU) に対するモノクローナル抗体を調製し、尿中に含まれるこれら修飾核酸の簡易測定法を確立した。本研究では、水柿らにより確立された方法を用いることにより、尿中修飾核酸の腫瘍マーカーとしての応用性を明らかにした。さらに、細胞中に含まれる修飾核酸量についても検討した。

## 2. ヒト尿中の修飾核酸量

健常人を対象として、尿中 m1Ado 及び PU 量の年齢による変動及び各年齢における性差について検討した。その結果、年齢差及び性差は認められず、健常人では尿中への m1Ado 及び PU 排泄量はほぼ一定であることが明らかになった。次に、特に尿中修飾核酸の増加が多く見られる白血病及びリンパ腫について、詳細に検討した。白血病及びリンパ腫患者尿中の PU は健常人と比較して高値を示したが、疾患の種類による差異は認められなかった (Fig. 2A)。また、患者を臨床所見から、寛解、安定、再発の 3 群に分け、各群における尿中 PU 量を検討したところ、これらの修飾核酸量は患者群毎に相違を示し、病態をよく反映した (Fig. 2B)。同様な傾向は、m1Ado においても認められた。これらのことから、尿中の m1Ado 及び PU が、白血病及びリンパ腫の腫瘍マーカーとして応用可能であり、またこれらの疾患のモニタリングにも応用できることが明らかになった。

## 3. マウス血清中の修飾核酸量

修飾核酸の変動を検討するにあたり、尿を検体として用いた場合、クレアチニン補正が必要であること、あるいは小動物を用いた基礎的検討が行いにくいことなどの短所があった。そこで、m1Ado の測定法を高感度化し、さらに前処理法として限外ろ過を行うことにより、血清中の m1Ado 及び PU の測定を可能にした。BALB/c マウスに同系の腫瘍である Meth A を腹腔内移植し、腹水型腫瘍モデルを作製した。これらのマウスの血清中 m1Ado 及び PU を測定した結果、がん日数の増加に従い、両修飾核酸量は増加した (Fig. 3)。同様な傾向は、固形腫瘍モデルにおいても認められた。がん細胞の増加に従い、血清中の修飾核酸量が増加することが実験モデルにおいて確認された。

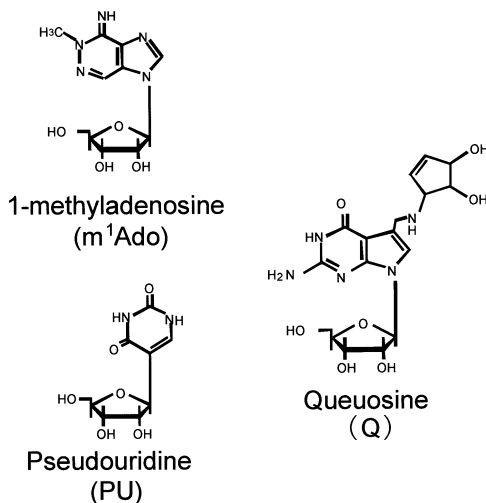


Fig. 1. Structures of modified nucleosides



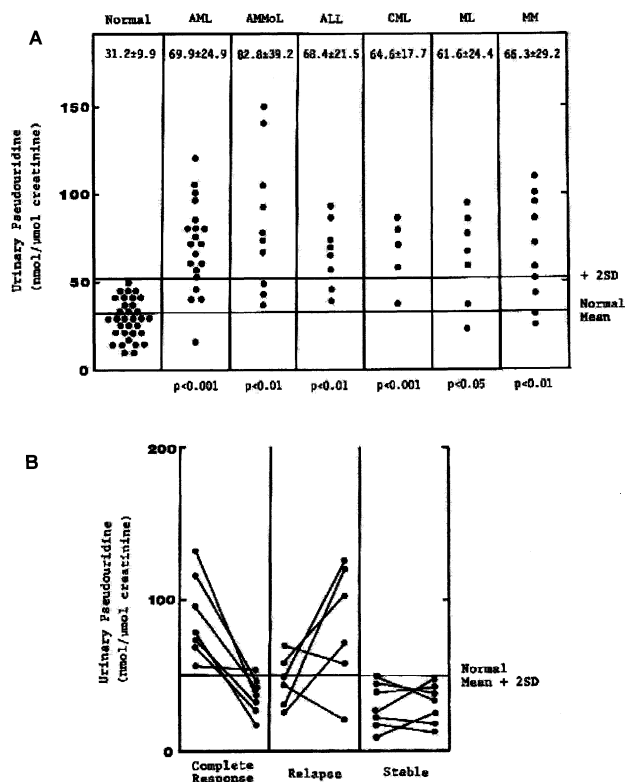


Fig. 2. A, Urinary excretion levels of pseudouridine in normal controls and patients with leukemia and lymphoma

Abbreviations of the diseases; AML: acute myelogenous leukemia, AMMoL: acute myelomonocytic leukemia, ALL: acute lymphoblastic leukemia, CML: chronic myelogenous leukemia, ML: malignant lymphoma, MM: multiple myeloma

B, Changes in the urinary excretion levels of pseudouridine with the changes in clinical status of patients with leukemia and lymphoma

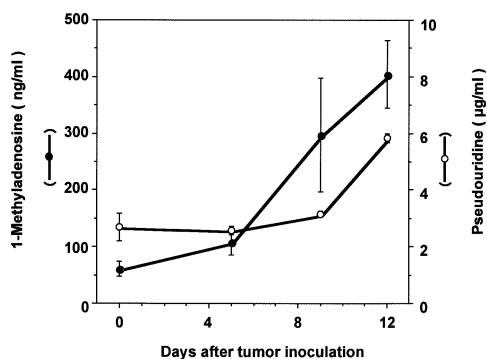
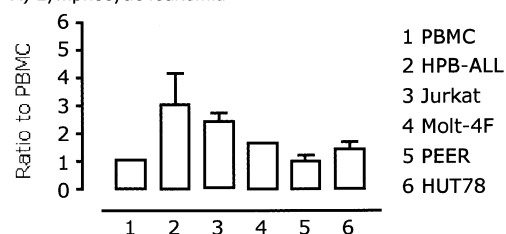


Fig. 3. Time course of 1-methyladenosine and pseudouridine levels in sera of mice bearing ascites tumor

#### 4. ヒト細胞中の修飾核酸合成酵素量

がん細胞レベルでの修飾核酸の変動とがん性変化との関連性を検討するため、ヒト培養白血病細胞中の修飾核酸キューオシン (Q, Fig. 1) の合成酵素である tRNA-グアニントランスグリコシラーゼ (HuTGT) の量を健常人の末梢血単核球中の量と比較した。がん細胞中の HuTGT の発現は白血病細胞株中で亢進していた (Fig. 4A, B)。同様な傾向は、ヒトがん組織を用いた検討においても認められた。がん細胞においても修飾核酸量が増加していることが示唆された。本研究により、担がん個体レベル及びがん細胞レベルでの修飾核酸とがんとの関連性が示され、腫瘍マーカーや制がん剤の標的としての修飾核酸の臨床応用への可能性が示されたものと考えられる。

## A) Lymphocytic leukemia



## B) Myelogenous leukemia

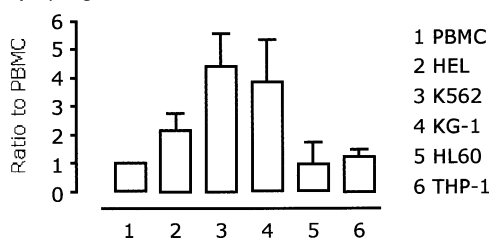


Fig. 4. The Expression levels of Hu TGT 60 kDa in human lymphocytic and myelogenous leukemia cell lines Cell lysate (50 mg) were subjected to 8% SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membrane, then stained with anti Hu TGT 60 kDa antibody. The intensities of visualized bands were calculated by use of the NIH image software and shown as the ratio to average intensity of PBMC.

## 5. 謝 辞

本研究を行うにあたりご指導を賜りました、本学医学部附属病院薬剤部・水柿道直先生、菱沼隆則先生及び秋田大学医学部附属病院薬剤部・伊藤邦彦先生に深謝いたします。